

Université de Montréal

**Nouvelles approches dans l'immunothérapie de la leucémie aigüe
lymphoblastique utilisant les récepteurs chimériques d'antigène**

Par

Aurélien Colamartino

Département de Microbiologie, Immunologie et infectiologie, Faculté de médecine

Thèse présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur

En Microbiologie et Immunologie

Mai 2020

© Aurélien Colamartino, 2020

Université de Montréal

Unité académique : département de Microbiologie, Immunologie et Infectiologie, Faculté de
Médecine

Cette thèse intitulée

**Nouvelles approches dans l'immunothérapie de la leucémie aigüe lymphoblastique utilisant
les récepteurs chimériques d'antigène**

Présenté par

Aurélien Colamartino

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Jean-Sébastien Delisle
Président-rapporteur

Elie Haddad
Directeur de recherche

Denis-Claude Roy
Membre du jury

Yannick Doyon
Examineur externe

Résumé

L'immunothérapie a permis des avancées majeures dans la thérapie du cancer. Le traitement par des cellules T modifiées pour exprimer un récepteur chimérique d'antigène (CAR) a changé complètement la vision de la thérapie de la leucémie. L'efficacité de ce traitement sur des cancers résistants, a ouvert la voie à la thérapie cellulaire et génique dans ce contexte. Malgré les premiers résultats très positifs, il s'avère que l'épuisement cellulaire et la perte des cellules T thérapeutiques est un problème majeur pour maintenir l'efficacité de la thérapie CAR et prévenir les rechutes. Les travaux présentés dans cette thèse visent à permettre l'utilisation d'autres types cellulaires pour la thérapie CAR. L'hypothèse de travail est que les cellules NK ou les cellules souches hématopoïétiques (HSC) permettrait de dépasser les limites de la thérapie CAR utilisant les cellules T. Pour permettre l'utilisation des cellules NK, un des problèmes technique est la transduction par les vecteurs viraux. Les travaux présentés ici démontrent que l'utilisation de l'enveloppe BaEV permet une transduction efficace des NK avec un vecteur lentiviral. Par cette méthode nous avons pu générer de grandes quantités de cellules NK transduites avec un CAR, prouvant la possibilité d'utiliser les NK dans la thérapie CAR. L'utilisation des HSC dans la thérapie CAR, permettrait de produire des cellules CAR T en permanence pour renouveler les cellules T épuisées. Cependant, la surexpression d'un récepteur CAR sur toutes les cellules dérivant des HSC pourrait être un problème. Pour permettre l'utilisation des HSC, nous avons développé des promoteurs spécifiques courts restreignant l'expression du transgène à une population précise. Nous avons prouvé la spécificité d'un promoteur T et démontré la possibilité de l'utiliser dans le contexte de la thérapie CAR utilisant les HSC. Ces travaux sont une preuve de concept de l'utilisation d'autres cellules que les cellules T dans la thérapie CAR.

Mots-clés : Immunothérapie, Leucémie, cellule NK, Cellule souche hématopoïétique, Transduction, Promoteur spécifique, Cancer, Cellule T.

Abstract

Immunotherapy has allowed major advances in cancer therapy. The treatment using modified T cells with a chimeric antigen receptor (CAR) completely changed the vision of leukemia therapy. The efficiency against resistant cancer paved the way to cellular and gene therapy in this context. Despite very positive results at first, the disappearance and exhaustion of therapeutic cells seems to be a major problem to maintain the efficiency of the CAR treatment and prevent relapses. The work of this thesis is to allow the use cell types other than T cells for CAR therapy. The hypothesis is that NK cells or hematopoietic stem cells (HSC) could overcome the limitation of CAR therapy using T cells. To allow the use of CAR NK cells, a major technical issue is the transduction by viral vectors. The work presented here shows the use of BaEV envelope to pseudotype vectors allows an efficient transduction of NK cells. Using this method, we were able to produce large amounts of CAR NK cells, showing the possibility to use NK cells in CAR therapy. The use of HSC in CAR therapy, could allow the permanent replenishment of the pool of CAR T cells once exhausted. Despite that advantage, the overexpression of a CAR receptor on all hematopoietic cells coming from those HSC could be an issue. To allow the use of HSC, we developed short specific promoters restraining the expression of the transgene to a precise population. We prove the specificity of a T cell promoter and demonstrated the possibility to use it in CAR therapy using HSC. This work is a proof of concept of the use of other population than T cells in CAR therapy.

Keywords : Immunotherapy, Leukemia, NK cell, Hematopoietic Stem Cell, Transduction, Specific Promoter, Cancer, T Cell.

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux	15
Liste des figures	17
Liste des sigles et abréviations	19
Remerciements	27
Chapitre 1 – Introduction	31
1. La Leucémie.....	31
1.1. Les mécanismes d'apparition du cancer	32
1.1.1. Les mutations initiatrices.....	32
1.1.2. Amplification des clones initiateurs	32
1.1.3. Mécanismes cellulaires anti-cancéreux	35
1.2. La Leucémie.....	37
1.2.1. Mécanismes d'instabilité génétique de la leucémie.....	37
1.2.2. Prévalence et facteurs de risque.....	38
1.3. Les traitements de la leucémie	39
1.3.1. Les effets secondaires	40
2. Le système immunitaire face au cancer	41
2.1. Les cellules Natural Killer (NK).....	42
2.1.1. Le développement des cellules NK	42
2.1.2. Signalisation NK.....	44

2.1.2.1.	Les signaux activateurs.....	44
2.1.2.2.	Les signaux inhibiteurs.....	45
2.1.2.3.	L'intégration du signal.....	46
2.1.3.	Les mécanismes de cytotoxicité	46
2.1.3.1.	La dégranulation.....	47
2.1.3.2.	Les récepteurs de mort.....	49
2.2.	Les cellules T	51
2.2.1.	Le développement des cellules T.....	51
2.2.1.1.	Développement dans la moelle.....	51
2.2.1.2.	Sélection thymique et recombinaison du TCR	52
2.2.2.	La fonction des cellules T.....	54
2.2.2.1.	L'activation des cellules T.....	54
2.2.2.2.	L'inhibition des cellules T.....	55
2.3.	L'immunoédition et l'évasion tumorale.....	57
2.3.1.	La régulation du MHC.....	57
2.3.2.	La perte de ligands activateurs	58
2.3.3.	La sécrétion de cytokines.....	59
2.3.4.	L'augmentation des ligands inhibiteurs.....	60
2.3.5.	Blocage des interactions et de la formation de la synapse.....	61
3.	L'immunothérapie.....	62
3.1.	La greffe de cellules moelle osseuse ou greffe de HSC.....	63
3.1.1.	Les NK dans la greffe de moelle	63
3.1.2.	Les T dans la greffe de moelle.....	64
3.1.3.	Les désavantages de la greffe de moelle.....	65

3.2. Les traitements cytokiniques.....	66
3.2.1. L'interféron- α	67
3.2.2. L'Interleukine-2.....	67
3.2.3. L'Interleukine-15 et les autres traitements	68
3.3. Les bloqueurs de récepteurs inhibiteurs.....	69
3.3.1. L'anti-CTLA4.....	70
3.3.2. Les anti-PD1 et anti-PDL1	71
3.3.3. Les limites des inhibiteurs de point de contrôle	71
3.4. Les anticorps monoclonaux ciblant le cancer	73
3.4.1. L'anti-CD20, Rituximab.....	73
3.4.2. Les BiKE et TriKE (Bispecific et Trispecific Killer cell Engager).....	74
3.5. Les Récepteurs Chimériques d'Antigènes	76
3.5.1. La structure des CAR	76
3.5.2. Le scFv et la problématique de la cible	78
3.5.2.1. Toxicité selon la cible.....	78
3.5.2.2. Types d'antigènes cibles.....	80
3.5.3. La charnière et le segment transmembranaire	81
3.5.4. Les segments internes et la signalisation.....	82
3.5.5. Le succès clinique des CAR	84
3.5.6. Les problèmes des CAR	84
3.5.6.1. La toxicité de la thérapie CAR	84
3.5.6.2. La perte de l'antigène cible.....	85
3.5.6.3. La difficulté de production des cellules thérapeutiques	86

3.5.6.4. Épuisement et disparition des cellules thérapeutiques : l'importance du signal tonique	87
3.5.7. L'utilisation des NK dans la thérapie CAR	89
4. Hypothèse et objectifs	91
4.1. Hypothèse	93
4.2. Objectifs	93
Chapitre 2 – Premier article	95
1. Introduction du premier article	95
2. Premier article	96
2.1. Figure 1	114
2.2. Figure 2	115
2.3. Figure 3	116
Chapitre 3 – Brevet	119
Chapitre 4 – Deuxième article	121
1. Introduction du deuxième article	121
2. Deuxième article	122
2.1. Tableau	140
2.2. Figures	142
2.2.1. Figure 1	146
2.2.2. Figure 2	147
2.2.3. Figure 3	148
2.2.4. Figure 4	149
2.2.5. Figure 5	150
2.2.6. Figure 6	151

2.2.7.	Figure 7	152
2.2.8.	Figure S1	153
2.2.9.	Figure S2	154
2.2.10.	Figure S3	155
2.2.11.	Figure S4	156
Chapitre 5 – Discussion et Perspectives		157
3.	Analyse et implications des résultats	157
3.1.	La transduction des NK et la thérapie CAR	157
3.1.1.	L’impact d’une méthode de transduction efficace des NK	157
3.1.2.	Optimisation des CAR pour les NK	159
1.1.2.1	Utilisation de segments de récepteurs NK	159
1.1.2.2.	Utilisation de segments de récepteurs aux cytokines	159
3.1.3.	L’utilisation des NK issues d’iPSC	160
3.2.	La génération de nouveaux promoteurs spécifiques	161
3.2.1.	La génération de promoteurs basés sur les enhancers déterminés par CAGE	161
3.2.2.	Les utilisations des promoteurs spécifiques	162
3.3.	L’utilisation des HSC pour la thérapie CAR	163
3.3.1.	Les avantages et inconvénients des HSC dans la thérapie CAR	163
3.3.1.1.	Les avantages de l’utilisation des HSC	163
3.3.1.2.	Les désavantages de l’utilisation des HSC	165
3.3.2.	Les HSC dans la thérapie CAR, un casse-tête immunitaire	168
3.3.2.1.	Le signal tonique pendant la différenciation	169
3.3.2.2.	La liaison du CAR avec les cellules B dans le thymus	169
3.3.2.3.	Une tolérance du signal CAR ?	171

4.	Futur de la thérapie CAR	175
4.1.	Les combinaisons d'immunothérapie	175
4.1.1.	Combinaison avec les inhibiteurs de point de contrôle	175
4.1.2.	Combinaison avec les cytokines.....	176
4.1.3.	Les CAR « en armure »	176
4.1.4.	Les combinaisons de CAR	177
4.1.4.1.	Deux CAR pour une même cellule.....	177
4.1.4.2.	Un CAR pour deux cellules différentes.....	178
4.2.	Traitement des cancers solides.....	179
4.2.1.	Le problème de persistance	179
4.2.2.	Les cibles pour les tumeurs solides	180
4.2.2.1.	EGFR et EGFRvIII.....	181
4.2.2.2.	Le GD2 pour le neuroblastome.....	181
4.2.2.3.	Les futures cibles des CAR, l'exemple de Tn-MUC1	182
4.3.	La découverte de nouvelles cibles	183
4.3.1.	Le séquençage pour déterminer de nouvelles cibles.....	184
4.3.2.	L'immunopeptidome comme cible.....	185
4.3.3.	Approches expérimentales de découverte de cible.....	185
5.	L'éthique des nouvelles thérapies	186
Chapitre 6 – Conclusion.....		189
Références bibliographiques		191
Annexes.....		237

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Liste de cible de CAR actuellement utilisées	78
--------------	--	----

Liste des figures

Figure 1. –	Caractéristiques du cancer.....	35
Figure 2. –	Proportions des anomalies génétiques retrouvées dans les leucémies aigües lymphoblastiques.....	39
Figure 3. –	Mécanisme de dégranulation.....	48
Figure 4. –	Mécanismes d'induction de l'apoptose par les récepteurs de mort.....	50
Figure 5. –	Développement T et marqueurs associés	53
Figure 6. –	Schéma d'un TriKE.....	75
Figure 7. –	Schéma de la structure d'un CAR	77
Figure 8. –	Schéma de liaison de scFv entraînant un signal tonique	89
Figure 9. –	Dynamique de reconstitution théorique des cellules anti-tumorales après une greffe de HSC	166
Figure 10. –	Schéma du modèle de différenciation proposé.....	174

Liste des sigles et abréviations

ABL1 : Abelson

ADN : acide désoxyribonucléique

ADCC : cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps

AIRE : régulateur autoimmun

ALL : Leucémie lymphoblastique aigüe

AML : leucémie myéloïde aigüe

APC : cellules présentatrices d'antigènes

ARN : acides ribonucléiques

Bak : protéine associée à Bcl2 K

Bax : protéine associée à Bcl2 X

BCR : récepteur des cellules B

BCR1 : breakpoint cluster region

BiKE : bispecific Killer cell engager

CAR : récepteurs chimériques d'antigène

CAIX : carboxy-anhydrase IX

CIK : cellules cytotoxiques induites par cytokines

CIR : récepteur chimérique immunitaire

CMV : cytomégalovirus

COSMC : core 1 β 3GalT specific molecular chaperone

CTL : lymphocytes T cytotoxiques CD8

CTLA4 : antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques

DAP : protéine d'activation DNAX

DISC : complexe induisant le signal de mort

DL : ligand delta

DN : cellules T doubles négatives CD4 CD8

DNAM-1 : molécule accessoire DNAX 1

DP : cellules T double positif CD4 CD8

DR : récepteurs de mort

EGFR : récepteur au facteur de croissance épidermal

ETV6 : translocation Ets-leukemia Virus 6

FADD : molécule adaptatrice associée à Fas à domaine de mort.

FasL : Fas-ligand

Fc : fragment cristalisable

FKBP : protéine fixant le FK503

GD2 : disialoganglioside

GM-CSF : facteur stimulateur de colonies granulocyte et macrophage

GRB : facteur de croissance lié au récepteur

GvH : effet du greffon contre l'hôte

GvL : effet du greffon contre la leucémie

HLA : antigène des leucocytes humains

HSC : cellules souches hématopoïétiques

HSV-TK : thymidine kinase du virus Herpes simplex

ICAM1 : molécule d'adhésion intercellulaire

ICOS : costimulation inductible des cellules T

IDO : indoleamine 2,3-dioxygenase

IFN- α : interféron- α

IFNAR : récepteur à l'interféron α et β

Ig : immunoglobuline

IL-X : interleukine-X

IL-XR : récepteur à l'interleukine X

iPSC : cellules souches pluripotentes induites

ITAM : motifs d'activation d'immunorécepteurs basés sur une tyrosine

ITIM : motifs inhibiteurs d'immunorécepteurs basés sur la tyrosine

ITSM : motif de signalisation d'immunorécepteurs basé sur une tyrosine de type switch

JAK : Janus kinases (JAK)

KIR : récepteurs de type immunoglobuline des cellules tueuses

LAG3 : gène d'activation des lymphocytes 3

LAT : complexe liant pour l'activation des cellules T

Lck : protéine tyrosine kinase spécifique aux lymphocytes

LFA1 : antigène associé aux fonctions lymphocytaires

MAPK : protéines kinases activées par mitogène MAPK

MHC : complexe majeur d'histocompatibilité

MIC : polypeptides reliés aux MHC de classe I

MLL : mixed lineage leukemia

MSC : cellules souches mésenchymateuses

MUC1 : mucine 1

NCAM1 : molécule neurale d'adhésion cellulaire 1

NCR : récepteurs de cytotoxicité naturels

NFAT : facteur nucléaire des cellules T activées

NFκB : facteur nucléaire κ B

NK : cellules natural killer

NKAES : système d'expansion et d'activation des cellules NK

PD1 : récepteur de mort programmée 1

PDL1 : ligand de PD1

PEG : polyéthylène-glycol

PGE2 : prostaglandine E2

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PKC : protéine kinase C

PLCγ : Phospholypase C γ

RAG : gènes activant les recombinaisons

RUNX1 : Runt-related transcription factor 1

SAP : protéines associées aux récepteurs SLAM

SH2 : domaine d'homologie Src 2

SHIP : inositol 5-phosphatase a domaine SH2

SHP : protéines tyrosines phosphatases à domaine SH2

Siglec : lectines de type immunoglobuline liant l'acide sialique

STAT : transducteurs de signal et activateurs de transcription

T-ALL : ALL issues de cellules T

TCF7 : facteur de transcription 7

TCR : récepteur des cellules T

TGF β : facteur de croissance tumorale β

TIM3 : protéine à domaine mucine et immunoglobuline des cellules T 3

TNF : facteur de nécrose tumorale

TNF-R1 : le récepteur au TNF

TRAIL : ligand inducteur d'apoptose lié au TNF

TRAIL-R : récepteur au TRAIL

TriKE : trispecific Killer cell engager

TYK2 : tyrosine kinase 2

ZAP : protéine kinase associée à la chaîne ζ

*« Dans la nature, tout a toujours une raison. Si tu comprends cette raison, tu n'as plus besoin de
l'expérience »*

-Léonard De Vinci

Remerciements

Je remercie mon jury de thèse Dr Delisle, Dr Roy, Dr Doyon et Dr Melichar pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie évidemment mon directeur le Dr Haddad. Vous êtes un scientifique exemplaire. Votre acharnement au travail n'a d'égal que votre humour et vos anecdotes. Être votre étudiant aura été une aventure incroyable, difficile à suivre tant vous êtes passionné par la science. Mais avant tout je retiens de vous une personne fondamentalement ouverte. Vous donnez une chance aux gens, sans apriori, et vous m'avez donné la mienne. J'espère que je vous ai prouvé que vous avez raison de faire ainsi.

Un merci à tout le labo qui ont été une famille d'adoption pour le petit étudiant expatrié que j'étais en arrivant. J'aimerais commencer par le commencement, Simon sans qui je ne serais pas dans ce labo et qui encore aujourd'hui est un pilier (un peu hors norme) du labo, merci mec. Les adultes responsables, Silvia toujours joviale et de bon conseil tant pour la science que pour la vie, Kathie la plume du labo qui m'a tant aidé (un grand merci tu fais un travail génial et tu es aussi un pilier du labo en dehors de la science), Panos la Grèce incarnée, Yuanyi master of mice, et encore avant Massar le flegme scientifique et François qui veille encore sur nous, vous avez été vraiment important pour moi. Vous m'avez appris, vous m'avez fait rire, et vous m'avez toujours conseillé avec bienveillance.

Je ne sais pas comment remercier assez mes comparses de doctorat. Chloé ma jumelle de thèse et William le désormais plus français des doctorants québécois. Le trio se sépare mais ça laisse une sacrée marque, je ne pense pas que vous vous débarrasserez de moi aussi facilement ! Awaille mes Kev'. Hugo un merci spécial à toi qui m'a vraiment aidé et soutenu, aventurier au grand coeur et raleur à ses heures, et Dédé parce que oui elle est belle et Axel parce que c'est un peu votre kid insupportable ! À mes stagiaires favoris Mélanie puis Rachelle parce qu'on ne peut pas être exclusif en stagiaire, c'était vraiment dur et vous avez fait un travail exemplaire. Un merci à Camille (et Mathieu) pour tous ces bons moments quand tu nous as rassemblé au chalet ! Andrei je te souhaite toute la réussite dans la suite.

Un merci et surtout un bon courage à la nouvelle génération du labo, Delphine, Harika, Alice, Vincent, Renaud, Khampoun, votre soutiens pendant cette rédaction était salvateur vous allez faire des merveilles ! Clara je te lègue mon travail, je ne sais pas si c'est un cadeau, mais j'ai confiance, tu en feras quelque chose de bien !

Merci à tout cet entourage, la grande famille St-Justine, le lab Beauséjour qui n'a jamais vraiment divorcé de nous Cynthia, Gael, Kerstin, Pascal, Basma, Oanh je sais que vous regrettez de ne plus être à coté de nous. Le labo Decaluwe, JC (et Mag), Sarah, et Chloé puis la version 2.0, Alexis, JJ, Clémence, Mitra, Edouard, Benoitte, encore de belles aventures vous attendent. Le labo Touzot, qui, au-delà de nous piquer des enzymes, nous aide bien dans la science et dans le fun ! Merci Fabien, Blandine, Lorie et Aissa. Le labo Duval, merci à Paolo, Sabine, Mélanie, on a fait de belles experiences. Joëlle qui m'a enseigné à enseigner... et la patiente aussi. Mathieu mon vampire favori. Thomas, la belgique était bien représentée, tu as réussi tout ça avec brio ! Andrea best dungeon master of St-Justine good luck for your future adventure!

J'en oublie encore tellement mais vous avez tous été géniaux !

C'est un travail de fou que l'on fait et c'est pour ça que j'adore, mais sans vous tous cela m'aurait vraiment rendu fou. Et pour arriver au bout il m'aura fallu le soutien de bien du monde, même en dehors du lab. Tout d'abord ma famille bien que loin de vous j'ai toujours senti votre soutiens.

Papa, maman, Léa, j'espère que je vous rends fier, c'est vous aussi qui avez fait tout ce travail, qui avez veillé sur moi depuis tout ce temps. Je ne le dit pas souvent mais je crois que je n'y couperai pas, je vous aime de tout mon cœur, vous êtes le soutiens indispensable qui m'a construit jusqu'à aujourd'hui.

Mamie Nicole, et mon Gros-père, vous êtes un exemple depuis toujours et vos valeurs m'inspirent chaque jour. Tonton Mic, le grand frère par procuration, l'adolescent pour toujours, un immense merci pour ton aide depuis le début, un parrain comme même la pègre n'en fait pas. Dedette, François et les deux petits monstres, ça me fait toujours un bien fou de me retrouver coincé entre les sommets blancs avec vous.

J'oublie tellement d'autres Saint-André et affiliés, mais vous avez tous comptés pour moi, chaque moment où je vous vois ce sont de doux souvenirs qui m'ont bien aidé durant ces années.

Mamie Rosa, papy Leonardo, je sais que vous veillez toujours sur moi. Leonardo, merci pour la calvitie je sais que c'est pour que tu veilles sur mes pensées et mes peurs.

Un grand merci à ma marraine Elisabeth toujours tendre et encourageante, aux Vito qu'ils soient petit ou grand ou plus grand que le grand qui est plus petit, vous êtes tous de grands esprits. Toto mon cousin comparse de toujours, Popo, et Christine, tata Marie et Christian et tout ce monde que je suis si content de retrouver devant un repas de Noël bien trop copieux pour mon estomac ! A tata Vittoria et Elodie que j'ai été heureux de retrouver de ce côté de l'Atlantique, ça fait du bien la visite. Laure et Mathieu pour cette superbe virée New Yorkaise ! Les Colamartino sont trop nombreux pour tous être cités ici mais je vous remercie tous de votre énergie votre entourage et votre soutien.

Un merci à tous mes amis qui sont autant de soutiens depuis tout ce temps, autant depuis la France que ceux rencontrés lors de cette aventure au Canada.

Benoit tu as toujours été cet ami que j'appelle deux fois l'an et que je retrouve comme si on ne s'était pas quitté, j'ai hâte à de nouvelles aventures ensemble. Matthieu, Boris depuis la cours de récré à la chaussée jusqu'à votre paternité, on a tous grandi ensemble et même si aujourd'hui on se voit peu c'est toujours un plaisir de vous retrouver dès que possible.

A ma bande du lycée, je suis super content d'avoir de vos nouvelles à chaque fois, Anais, Anna, Lucie, Paul. On sera des ados pour toujours. Merci à Lucie c'était un plaisir de partager cette expérience canadienne avec toi et merci pour ton support depuis tout ce temps !

Les tourangeaux inimitables, toujours prêts à lacher une vanne bien sentie pour rebooster les troupes. Le gang du crous, Rousseau, Maurice, Floppy, Herlock, Toto, Seb =], Busto, Stan, Grolivier, Max Tac, Simon, Leonidas, même si le statut de certains n'était pas légalement habitant on a passé trop de bon temps dans ces 9m2 ! Marie-Pierre (ben non je ne t'oublie pas ne t'énerve pas !), Camille, Solène, ça prenait bien un peu de féminité pour calmer tous ces sales gosses. Un merci à Florian qui a été touché par le cancer pendant ce travail de doctorat. Ton courage et ta détermination exemplaire m'ont montré que même dans les pires moments il faut garder l'espoir et l'énergie. Tu as vaincu le cancer dans ton corps, à nous de le vaincre dans notre science.

Mon passage à Paris m'aura aussi fait de bon souvenir et des amis scientifiques qui m'ont suivi par-delà l'océan, Caro, Alan, super content que la science nous ait fait nous rencontrer, vous êtes

vraiment top (toi Alan tu es différent mais on t'aime quand même !). Merci à Didier, sans qui je ne serais pas dans ce super labo !

Les d'Ibervillageois ont rendu le début de cette aventure canadienne incroyable et sont vraiment devenus des amis importants ! Noé (un petit spécial pour le coloc le plus extravagant!), Brieux, Arthur, Yous, John, Chloé, et tellement d'autres qui ont fait partie de cette belle expérience humaine. Cette petite gang de chum s'est agrandie avec le temps, Julie (et maintenant Charlie), Camille, Quentin, Charles vous m'avez soutenu et fait rire et j'en avais vraiment besoin. Ninon, Amaury des colocs en or depuis le début de cette aventure et des amis après.

Et je dois terminer par la personne sans qui tout cela ne serait pas arrivé, celle qui m'a soutenu tous les jours de ce doctorat et qui, encore aujourd'hui, me soutiens. Cette thèse tu en es aussi un peu l'auteure. Merci Sylvia, je t'aime de tout mon cœur.

Chapitre 1 – Introduction

Le cancer semble aussi vieux que l'homme, on retrouve mention de cette maladie jusque dans l'Égypte antique, dans le manuscrit d'Edwin Smith (1). Mais, aussi vieux soit-il, il est un des vastes problèmes de santé de ce siècle. Il touche toutes les populations et malgré les progrès des traitements il continue d'être mortel dans de nombreux cas. En 2012, au Canada, 30% des décès étaient attribués au cancer, représentant la plus forte cause de mortalité (2). Parmi ceux-ci les plus fréquents sont les cancers du poumon et de la prostate (3). Mais chez les enfants le cancer le plus fréquemment diagnostiqué est la leucémie (4). La leucémie est catégorisée selon les cellules qui sont à l'origine du cancer et possède de nombreux sous-types (5). La présente étude s'intéresse aux nouvelles thérapies du cancer et plus précisément dans le contexte de la leucémie.

1. La Leucémie

Le cancer est aujourd'hui la deuxième cause de mortalité dans le monde, selon l'organisation mondiale de la santé avec 9,6 millions de morts en 2018 (6). Le cancer est une problématique médicale mais aussi sociétale. Son impact sur la vie de millions de personnes n'est plus à prouver. Maladie grave, parfois incurable, le cancer impacte toujours irrémédiablement la vie du patient, même une fois guéri. Les traitements sont contraignants, ont de graves effets secondaires et un coût très élevé (7-9). L'impact psychologique se ressent très largement sur le patient mais aussi son entourage (10, 11). Au niveau de la société entière, le cancer a aussi un impact dramatique. En dehors d'un coût financier très important pour les traitements, la maladie implique un arrêt de travail et des séquelles qui augmentent encore son coût pour la société (12-14).

Le cancer est une maladie complexe et difficile à traiter et, au vu de la problématique qu'il représente, il est une priorité de développer de nouvelles thérapies. Pour cela il est important de comprendre les mécanismes qui mènent à l'apparition du cancer et pourquoi il se développe.

1.1. Les mécanismes d'apparition du cancer

1.1.1. Les mutations initiatrices

Les cellules cancéreuses tirent systématiquement leur origine d'une cellule ayant subi une mutation dans une région génomique clé (15). De nombreux facteurs externes peuvent être à l'origine de ces mutations. Les rayonnements ionisants, rayons X ou gamma, peuvent briser les liens entre les nucléotides et générer des cassures des acides désoxyribonucléiques (ADN) (16, 17). Ces cassures devant être réparées, elles peuvent mener à des erreurs de réparation et donc à des mutations. Il est à noter que dans une moindre mesure, les rayonnements UV non-ionisants peuvent avoir le même effet et sont une cause importante de développement de mélanome (18-20).

En dehors de ces phénomènes physiques, de nombreux autres stress environnementaux peuvent mener à une déstabilisation de l'ADN. Des agents chimiques, appelés carcinogènes, vont avoir le même effet de cassure de l'ADN (21, 22). Une des sources les plus reconnue d'agent chimiques carcinogène est la fumée de tabac; elle contient des benzopyrene, de la dimethylnitrosamine et du nickel, entre autres, qui en font une cause reconnue de la majorité des cancers du poumon (23, 24) mais on retrouve également l'exposition à certains pesticides (28). Enfin les stress cellulaires issus de l'activité biologique peuvent provoquer des mutations initiatrices de cancer (25). La consommation d'alcool et le stress hépatique qui en découle sont une cause reconnue de cancer du foie (26, 27). Certaines maladies génétiques sont aussi un facteur de risque comme la trisomie 21. Il est également possible que des cancers se développent suite à une infection virale. Le virus du papillome humain est responsable d'un grand nombre de cancer du col de l'utérus (29). En effet les intégrations d'ADN viral peuvent induire une transformation des cellules vers un phénotype cancéreux (30, 31).

1.1.2. Amplification des clones initiateurs

Une fois la mutation initiatrice apparue il est possible que la tumeur reste bénigne. Certains éléments peuvent activer la prolifération des cellules tumorales et favoriser le développement d'un cancer. Les phorbols esters par exemple vont stimuler la prolifération cellulaire via le signal de la protéine kinase C (PKC) (32). Les traitements hormonaux peuvent favoriser le développement des cancers. Par exemple, les œstrogènes, favorisant la prolifération endométriale, peuvent faire proliférer un clone malin (33). De manière plus générale, l'inflammation locale est aussi un facteur facilitant la prolifération tumorale (34). L'inflammation va engendrer la sécrétion de cytokines qui favorisent la régénération en temps normal, mais va, dans le cas du cancer, aussi favoriser la prolifération des cellules malignes. Par exemple l'interleukine-1 β (IL-1 β) va enclencher la sécrétion de facteurs de croissance, comme la prostaglandine E2 (PGE2), qui activent la prolifération (35, 36). De plus la réaction inflammatoire va générer un stress oxydant qui va lui-même être à l'origine de nouvelles mutations.

Bien que ces éléments initiateurs soient essentiels pour l'apparition du cancer, ils ne causent pas systématiquement de prolifération pathologique. On parle alors de tumeur bénigne. C'est l'accumulation de mutations successives et leur impact sur la régulation de la prolifération qui va rendre ces cellules réellement cancéreuses (37, 38). On trouve de nombreux exemples de tumeurs bénignes, comme les nævi ou les kystes. Les cancers se différencient des tumeurs bénignes par leur capacité à envahir les tissus environnant et à se propager (39). En ce sens le cancer est la résultante d'une accumulation de mutations qui va favoriser un clone cellulaire spécifique par rapport à son environnement. Ces mutations vont lui conférer des caractéristiques précises qui vont favoriser le développement tumoral. Le cancer va se développer et envahir les tissus environnants d'autant plus rapidement qu'il aura acquis ces caractéristiques en grand nombre (Figure 1). On peut citer, parmi ces éléments, la néo vascularisation qui va permettre d'alimenter plus efficacement la tumeur et donc favoriser sa croissance (40, 41), ou la mise en place de mécanismes qui favorisent la transition épithélio-mésenchymateuse, qui va permettre la dissémination des cellules et donc la formation de métastases (42).

La prolifération d'une cellule ayant déjà des mutations est donc un facteur de risque supplémentaire, si une cellule dérégulée entre en mitose plus rapidement elle peut accumuler des mutations plus vite. Il est donc possible qu'une prolifération forte favorise l'acquisition de

caractéristiques cancéreuses, justifiant la prolifération comme un facteur central dans l'établissement de la maladie.

A l'inverse la prolifération peut être néfaste pour la cellule cancéreuse elle-même, plusieurs mécanismes pourraient être problématiques au développement du cancer. La prolifération excessive peut enclencher des mécanismes de sénescence, limitant ainsi le potentiel cancéreux. Ce sont seulement les clones qui sont capables de surpasser la sénescence qui vont pouvoir se maintenir. Une prolifération incontrôlée peut aussi entraîner des erreurs critiques de mitose qui ne permettent plus la survie de la cellule. Certaines anomalies mitotiques peuvent entraîner des pertes de portions, voire de chromosomes complets aboutissant à la mort cellulaire ou à un désavantage majeur pour sa prolifération. Au niveau tissulaire une prolifération anarchique peut aussi être un désavantage pour la prolifération. Une croissance tumorale rapide nécessite un apport de nutriment important et donc une vascularisation suffisante et une organisation tridimensionnelle adéquate.

En ce sens une tumeur pour devenir cancéreuse va trouver un équilibre dans sa progression et évoluer en s'adaptant pour maintenir cet équilibre au niveau cellulaire et tissulaire dans son microenvironnement tout en continuant sa croissance et en acquérant ses caractères malins (Figure 1).

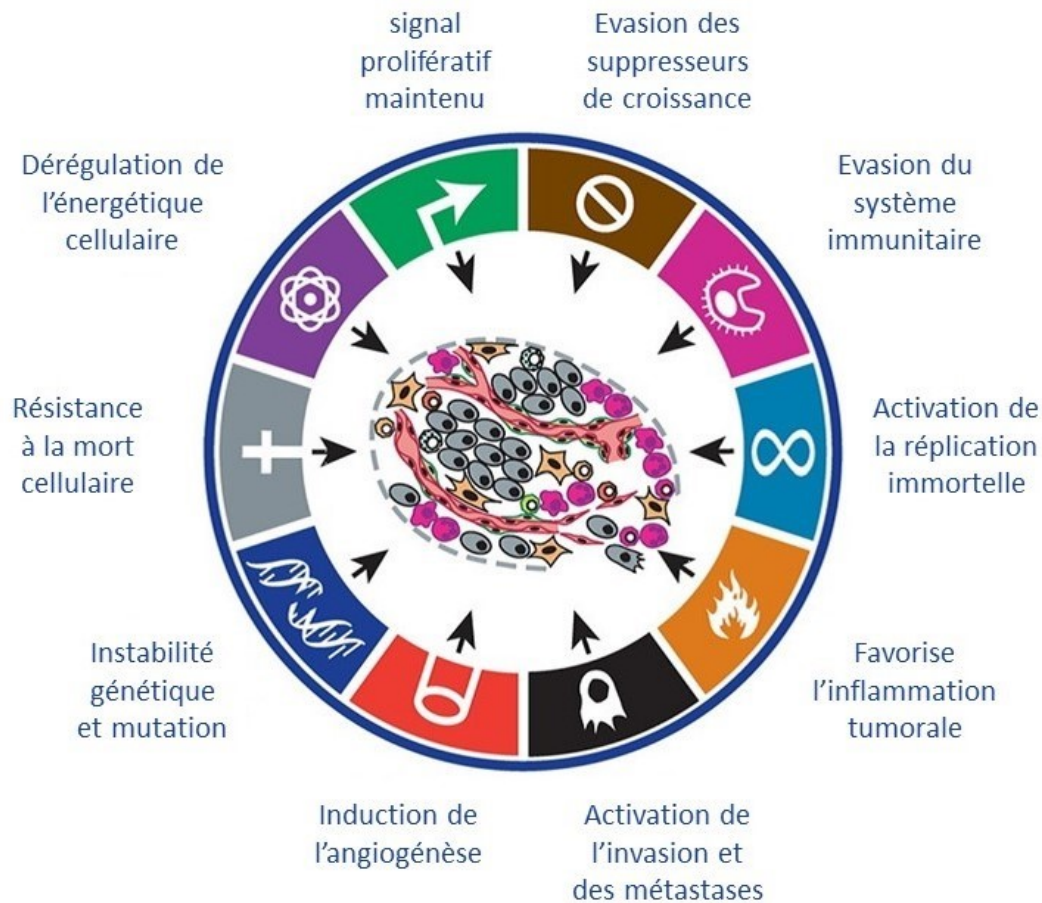


Figure 1. – Caractéristiques du cancer

(traduit de Douglas Hanahan, Robert A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, Cell, Volume 144, Issue 5, ©2011 Pages 646-674 avec la permission d'Elsevier)

1.1.3. Mécanismes cellulaires anti-cancéreux

De nombreux mécanismes sont en place pour prévenir la formation de cancer via ces mutations. Le premier mécanisme qui va prévenir l'apparition de mutation est la réparation de l'ADN. Lors d'une cassure de la molécule d'ADN, la cellule va devoir rétablir l'intégrité de son génome. Pour cela elle va utiliser deux processus majeurs (43). Le premier est la liaison de brin non-homologues,

où les protéines Ku70 et Ku80 vont reconnaître les deux brins séparés et recruter la ligase ADN 4 qui va pouvoir relier les deux extrémités (44). Ce mécanisme peut être imparfait et introduire des nucléotides ou en éliminer (45, 46), engendrant ainsi une ou plusieurs mutation(s). Le second mécanisme utilise un modèle de réparation, il s'agit de la recombinaison par homologie dirigée. Dans ce cas la zone touchée par la cassure va être éliminée et le second allèle va être utilisé comme un guide pour synthétiser la portion d'ADN manquante. Pour cela l'homologie entre les deux régions va être utilisée pour aligner correctement les brins d'ADN et la polymérase va se lier pour copier ce modèle sur l'allèle initialement cassé, réparant ainsi la cassure sans introduction de mutation (47).

Il existe d'autres mécanismes permettant le contrôle de la réplication, lors du cycle de division. Des senseurs de stress génétique, tel qu'ATM (en anglais *ataxia telangiectasia mutated*), vont phosphoryler leurs substrats dont p53 (48, 49). L'activation de cette molécule est centrale dans la régulation du cycle en réponse à des dommages à l'ADN. Une fois p53 active elle va activer de nombreux gènes pour bloquer la prolifération, réengager les voies de réparation ADN et diriger vers l'apoptose les cellules dont le matériel génétique est trop endommagé (50-53). Ceci explique qu'une majorité des cellules cancéreuses ont des mutations de ces gènes codant pour des protéines impliquées dans les points de contrôles, soit de p53 directement ou soit de ses partenaires (54). Dans ces cas-là, la régulation du cycle est levée et les cellules porteuses de mutations dangereuses prolifèrent de manière incontrôlée. Étant donné les stress cellulaires et les sources si variées de mutations externes, le simple contrôle interne des cellules n'est pas suffisant. Ainsi la transformation tumorale peut arriver souvent dans l'organisme.

Bien que ces mutations puissent initier le processus tumoral, c'est l'acquisition de diverses caractéristiques qui va donner sa nature au cancer. Paradoxalement les mutations peuvent être délétères aux cellules comme vu plus haut, et ce seront plutôt les modifications épigénétiques engendrées par les mutations initiatrices ou par les interactions cellulaires au niveau du microenvironnement tumoral qui, dans ce cas, lui conféreront son caractère cancéreux.

Si les mutations peuvent nuire directement au cancer, elles peuvent aussi être un marqueur d'anomalie détectable par le système immunitaire. On retrouve donc nombre de cancer avec un faible taux de mutations somatiques qui vont échapper au contrôle du système immunitaire. La leucémie fait partie de ces cancers avec peu de mutations somatiques (55, 56).

Potentiellement toutes les cellules peuvent subir une transformation cancéreuse, bien que la prévalence varie selon les types cellulaires et les organes (57). Cette pluralité donne à chaque cancer ses caractéristiques propres dépendantes de son historique. Le comportement des cellules tumorales va changer selon le tissu d'origine mais aussi selon les mutations acquises au cours du développement de la maladie, selon le microenvironnement, les modifications épigénétiques et même en fonction des traitements reçus. En ce sens, chaque cancer est unique. Cette immense variété représente une difficulté pour soigner le cancer car le traitement doit être adapté en fonction de chaque type de cancer et même de ses caractéristiques propres (58-60).

1.2. La Leucémie

La leucémie aigüe lymphoblastique (ALL) est le cancer pédiatrique le plus diagnostiqué (61). Chez l'adulte, ce cancer est aussi présent bien que sa proportion soit réduite (62). Bien que les ALL pédiatrique soient curables dans environ 80% des cas en utilisant des traitements chimiothérapeutiques conventionnels, les 20% restants sont dans une vaste majorité des cas complètement résistants et donc mortels. Chez les patients adultes, ce taux de réponse tombe à 40% démontrant la limite des traitements actuels et le besoin de nouvelles options thérapeutiques pour ce cancer (63).

Ce cancer dérive de cellules lymphocytaires de plusieurs origines. On retrouve des ALL provenant de cellules T, parfois de cellules Natural Killer (NK) mais la vaste majorité de ces cancers proviennent de cellules B. On estime à 75% la proportion d'ALL issue de progéniteurs B (64).

1.2.1. Mécanismes d'instabilité génétique de la leucémie

Cette prévalence s'explique par l'instabilité génétique des précurseurs B pendant leur développement. En effet, lors de leur maturation, les cellules B doivent réarranger leur récepteur B (BCR) pour générer une grande variabilité d'anticorps et de reconnaissance. Les recombinaisons des gènes activant les recombinaisons (RAG) 1 et 2, vont réassembler les différents segments V,

D et J. Pour favoriser la diversité du répertoire BCR, des mutations peuvent s'introduire aux sites clivés (65). Dans ce contexte il est essentiel pour la cellule de tolérer une certaine instabilité génétique. Bien que normalement confinée aux régions VDJ, il est possible que ces recombinaisons lient ces fragments avec d'autres régions génomiques et donnent ainsi des fusions de gènes cancérigènes (66, 67). On retrouve dans de nombreuses leucémies des translocations issues de problèmes de recombinaisons. Les T-ALL (ALL issues de cellules T) vont arborer les mêmes types de problèmes génétiques liés à des recombinaisons similaires dans le cadre du réarrangement du récepteur des cellules T (TCR) (62, 68).

1.2.2. Prévalence et facteurs de risque

On retrouve de très nombreuses fusions et translocations avec une prévalence variable provenant de l'affinité pour les recombinaisons RAG pour certains loci (Figure 2).

Selon les altérations génétiques retrouvées, les ALL sont classifiées et évaluées en fonction de leur prévalence et du taux de survie qui leur sont associés. Plusieurs altérations génétiques ont un impact sur le pronostic chez les enfants atteints de ALL. Par exemple, une hyperdiploïdie élevée et la translocation t (12; 21) codant pour le gène de fusion Translocation Ets-leukemia Virus 6 (ETV6) avec Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) (69) sont associés à un résultat favorable des thérapies classiques. L'hypodiploïdie et les réarrangements de type Mixed Lineage Leukemia (MLL) (70), Breakpoint Cluster Region (BCR1) - Abelson (ABL1) (71), ainsi que l'amplification intrachromosomique du chromosome 21 sont associés à un risque élevé de rechute et une résistance aux traitements (61).

Bien que cette instabilité génétique soit souvent le point de départ de la leucémie elle ne suffit pas à elle seule à déclencher et maintenir la leucémie. Comme vu précédemment, les cancers sont issus de clones cellulaires qui accumulent des mutations favorisant leur prolifération et leur propagation. La leucémie va donc, une fois dérégulée par cet événement génétique initiateur, accumuler les mutations. C'est via ces mutations qu'elle peut acquérir des mécanismes de résistance aux traitements.

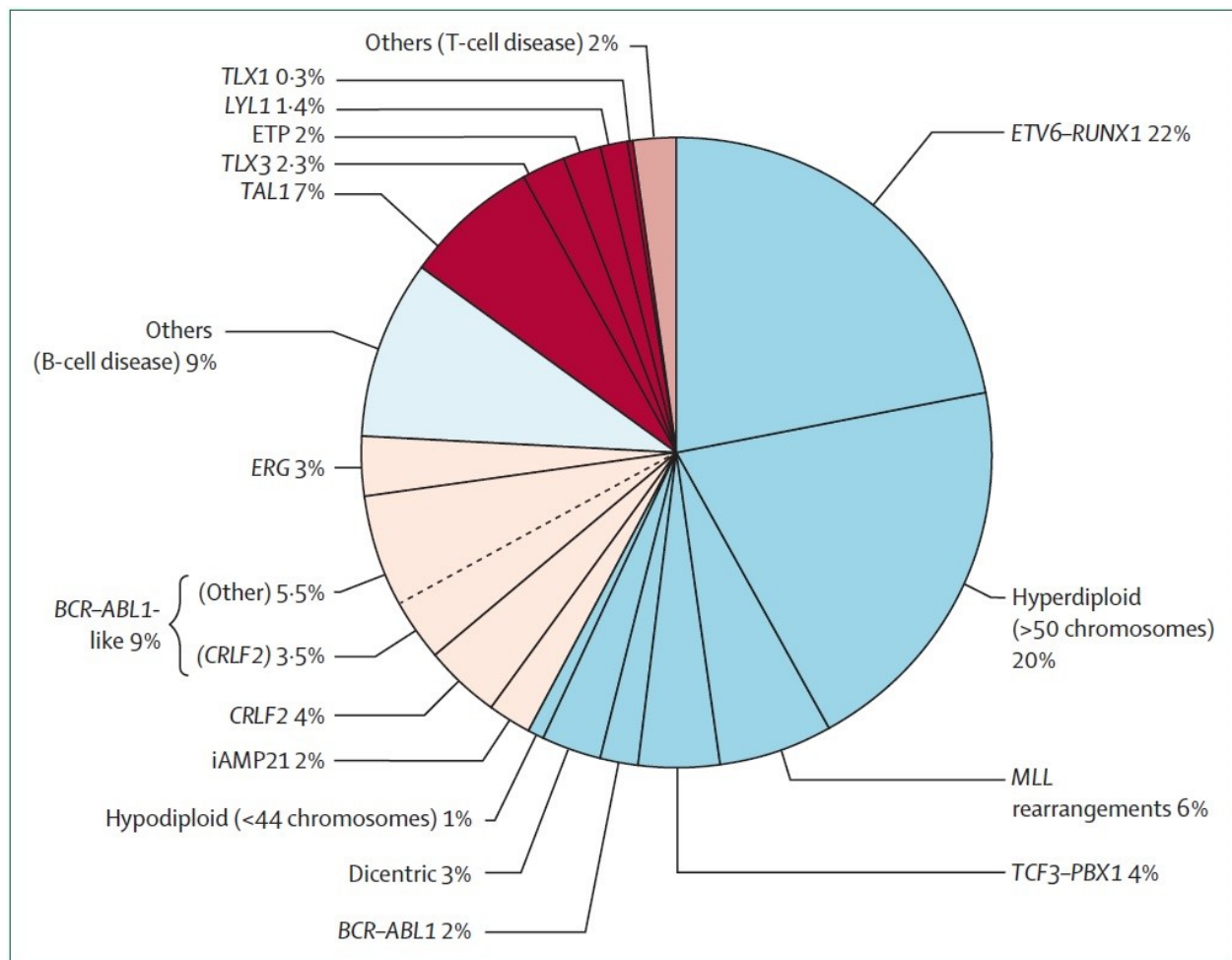


Figure 2. – Proportions des anomalies génétiques retrouvées dans les leucémies aiguës lymphoblastiques

(tiré de Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. ©2013 ; vol.381(9881) pages 1943–1955 avec la permission d’Elsevier)

1.3. Les traitements de la leucémie

Les traitements actuels sont principalement basés sur la chimiothérapie. Bien qu’efficaces, ils présentent de nombreux problèmes de toxicité, tant immédiate que sur le long terme.

Les protocoles de traitements de chimiothérapies peuvent varier mais sont aujourd'hui assez harmonisés pour l'ALL. Ils se décomposent en trois phases, la phase d'induction qui a pour but d'éliminer rapidement la majorité des cellules leucémiques, puis la phase de consolidation qui vise à éliminer les cellules résiduelles qui pourraient mener à une rechute, et enfin une phase de maintien qui permet un effet à très long terme et qui éliminera les cellules qui se réactiveraient pendant cette période (72). Ces protocoles combinent plusieurs molécules agissant sur différentes caractéristiques du cancer. On retrouve par exemple la vincristine qui est utilisée pour sa toxicité sur les cellules en division. Cet alcaloïde, extrait de la pervenche de Madagascar, bloque l'organisation des microtubules lors de la mitose et empêche donc la séparation des chromosomes, donnant ainsi un effet toxique sur les blastes qui sont en prolifération (73, 74). Pour attaquer le métabolisme des blastes, des asparaginases sont utilisées dans le traitement (75). Les blastes étant incapables de produire l'asparagine, contrairement aux cellules saines, ils vont mourir (76). Les anthracyclines telles que la doxorubicine complètent le traitement en attaquant l'ADN et favorisant l'apoptose (77).

1.3.1. Les effets secondaires

Ces cycles de traitement sont très difficiles à supporter et ont des conséquences à court et long terme sur la santé du patient.

Les effets immédiats des fortes doses de chimiothérapie peuvent être observés sur la peau et les cheveux. Les patients expérimentent systématiquement des nausées, des vomissements et des troubles intestinaux parfois à un niveau si intense que les doses de traitements doivent être diminuées (78). On retrouve un impact majeur sur la moelle osseuse car les mêmes molécules peuvent être utilisées comme conditionnement pour vider la moelle osseuse, et donc un impact sur les cellules sanguines des patients en découle. Le tractus gastro-intestinal et les reins sont aussi vastement affectés, en effet ce sont également des tissus qui se renouvellent vite et sont donc ciblés par les molécules de chimiothérapie (79).

A long terme, tous les organes du corps peuvent être affectés, y compris les organes essentiels, tels que le cœur, les poumons et le cerveau (80). Les traitements, pour être efficaces et prévenir une

rechute potentielle, doivent être administrés au plus proche du système nerveux central, il en découle donc des effets secondaires majeurs sur cet organe. La neurotoxicité des traitements peut induire à long terme de graves troubles psychiatriques, des cas de dépression, de somnolence, des paresthésies, voir dans des cas graves une paralysie ou des spasmes et un coma (81).

De plus, les effets chroniques de la chimiothérapie induisent la résistance aux médicaments, la cancérogénicité et l'infertilité (82, 83). En effet, avec maintenant un recul sur de nombreuses années, on retrouve à long terme chez les anciens patients qui ont eu des chimiothérapies, des cancers *de novo*, des syndromes néoplasiques qui se développent bien plus fréquemment que dans la population du même âge (84-86). Bien que non relié au cancer initial c'est le stress cellulaire généré par la chimiothérapie et la radiothérapie qui favorise ce phénomène.

Une autre problématique liée à la chimiothérapie est l'effet sur la fertilité (87). Bien que rarement abordé dans ce contexte et surtout chez l'enfant, c'est pourtant un enjeu important lors des soins (88). Pour les hommes matures sexuellement, il reste assez simple de cryopréserver des spermatozoïdes (89, 90), mais pour les femmes et les enfants la préservation des gamètes est plus complexe (91-93).

Ce dernier point est révélateur de l'impact sur la vie des patients ayant un cancer. Même si le patient survit, il va subir un traitement épuisant et douloureux qui va l'impacter, lui et son entourage pour le restant de ses jours. Il faut donc continuer l'étude de cette pathologie, ses mécanismes et interactions avec le corps et en tirer de nouvelles thérapies qui rendront la phrase précédente fausse en tous points.

2. Le système immunitaire face au cancer

Étant donné le nombre potentiel de cellules cancéreuses qui peuvent apparaître malgré les contrôles internes moléculaires, le corps a dû développer une deuxième barrière de défense. Logiquement le système immunitaire s'est développé pour remplir ce rôle. Les cellules immunitaires circulent partout dans l'organisme, elles entrent en interaction avec les cellules qu'elles rencontrent et ont un potentiel cytotoxique si elles détectent une menace pour l'organisme. Toutes ces caractéristiques

ont mené, lors de l'évolution, à mettre en place des mécanismes de détection du cancer par le système immunitaire (94).

2.1. Les cellules Natural Killer (NK)

Les cellules NK sont des lymphocytes catégorisés dans l'immunité innée, dont la fonction majeure est la destruction des cellules infectées par des virus ou des cellules tumorales (95-97). Elles sont au cœur de l'interaction entre système immunitaire et cancer.

2.1.1. Le développement des cellules NK

Les cellules NK, bien qu'étant catégorisées comme appartenant à l'immunité innée, sont apparentées, tant dans leur fonction que dans leur développement, aux cellules lymphocytaires de l'immunité adaptative et particulièrement aux cellules T cytotoxiques (98-100). A la différence des cellules T dont la fonction et le développement sont centrés autour de leur spécificité envers un antigène donné, les cellules NK sont capables de répondre à de nombreux signaux et de les intégrer ensemble pour réagir de manière appropriée à une menace potentielle.

Les cellules NK se différencient dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur lymphoïde. Le premier stade d'engagement dans la voie de différenciation des NK est l'expression du récepteur à l'IL-7 (101). Les cellules stromales de la moelle vont sécréter de l'IL-7 qui va démarrer la différenciation des cellules NK via ce récepteur. Entrent alors en jeu deux cytokines centrales dans le développement et la fonction des cellules NK : l'IL-21 et l'IL-15. Les cellules NK vont en effet toujours exprimer la chaîne commune γ des récepteurs de cytokines (102). Ce récepteur permet la transduction du signal des cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, et IL-21. Les complexes utilisés par les NK utilisent des chaînes α pour l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-21 principalement (103). Ces récepteurs n'ayant pas de fonction kinase propre, le signal subséquent à leur fixation est médié par les Janus kinases (JAK) qui vont phosphoryler les seconds messagers Transducteurs de Signal et Activateurs de Transcription (STAT) (104, 105). En fonction de ces combinaisons, les NK vont

répondre de manière différente. L'IL-21 va stimuler la prolifération des progéniteurs NK, et l'IL-15 va envoyer un signal de transition vers un phénotype NK immature (103, 106). Lors de la différenciation des progéniteurs vers le phénotype immature des NK, on voit l'apparition du récepteur β à l'IL-2 (IL-2R β) (CD122) qui va conférer une dépendance à l'IL-2 aux cellules NK (107). En progressant dans leur différenciation, les cellules NK matures vont acquérir l'expression de la molécule neurale d'adhésion cellulaire 1 (NCAM-1) (CD56) qui est le marqueur clé pour les définir (108). Cette molécule d'adhésion est constitutivement exprimée dans la population NK et permet d'ailleurs une différenciation des sous-types de NK matures.

Il est à noter que l'action de l'IL-15 utilise la transprésentation par les cellules de la moelle qui peuvent être des cellules présentatrices d'antigènes (APC) ou des cellules stromales. La chaîne α du récepteur à l'IL-15 est liée à cette dernière qui va être présentée à la membrane des cellules de la moelle osseuse pour interagir avec les récepteurs des cellules NK (109). Sans ce système de transprésentation, la signalisation par l'IL-15 ne se fait pas correctement et les NK ne pourraient pas continuer à se développer.

Les cellules NK immatures générées vont commencer à exprimer les marqueurs typiques de la lignée tels que NKG2D, NKG2A ou la molécule accessoire DNAX 1 (DNAM-1). En sortant de la niche hématopoïétique les cellules NK vont aller dans la circulation pour terminer leur maturation. Cette transition vers la circulation leur permet d'acquérir les marqueurs de classe de différenciation (CD) 43 et CD11b, deux molécules d'adhésion qui sont liées à leur phénotype effecteur final (110, 111).

Une fois en périphérie, on peut distinguer deux grandes populations de cellules NK, discriminables par les marqueurs CD56 et CD16 : les cellules CD56^{high} CD16⁻ qui semblent avoir une fonction productrice de cytokines, et les cellules CD56^{dim} CD16⁺, plus nombreuses, qui ont un rôle cytotoxique. Le lien entre ces deux populations reste incertain. Il est avancé par plusieurs études que les cellules CD56^{dim} seraient des effecteurs terminaux qui trouvent leur origine dans les CD56^{high}, les plaçant ainsi dans une continuité de différenciation (112-115). Il est cependant possible que ces cellules se différencient indépendamment et soient d'ailleurs capables de changer d'état. Ce modèle donnant une image plus plastique du compartiment NK envisage ces phénotypes non pas comme des états de différenciation mais comme une forme de polarisation réversible en fonction des besoins fonctionnels de l'environnement (116).

2.1.2. Signalisation NK

Les NK matures en circulation vont avoir pour rôle de se débarrasser des cellules infectées ou transformées. Pour les reconnaître, bien qu'elles ne fassent pas de recombinaison génique pour générer un récepteur spécifique, les cellules NK expriment un large panel de récepteurs qui vont leur permettre de déterminer leur état.

Les signaux que reçoivent les cellules NK sont intégrés et vont activer ou inhiber l'action cytotoxique. C'est la balance entre tous ces signaux qui détermine l'engagement de la cellule NK (117).

2.1.2.1. Les signaux activateurs

Un des principaux récepteurs activateurs des NK est le récepteur de fragment cristalisable (Fc) γ IIIa ou CD16 qui va leur permettre de détecter la fixation d'anticorps sur une cellule. Ce récepteur permet aux cellules NK d'induire une cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps (ADCC) (118, 119). En se fixant à la portion Fc des anticorps fixés sur la cible, les NK peuvent déclencher via CD16 un relargage de granules cytotoxiques. C'est un des seuls récepteurs capable à lui seul de déclencher cette activation complète (120). Cette réponse rapide et sa priorité sur les autres signaux témoigne de l'importance de ce mécanisme.

Les autres signaux activateurs sont souvent liés à des molécules de stress. Un des récepteurs activateurs majeurs NKG2D se lie aux molécules de stress, les polypeptides reliés aux complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe I (MIC) A et B (121). Dans un grand nombre de cellules cancéreuses ces ligands sont exprimés et permettent donc aux NK de détecter ces cellules. On retrouve aussi les récepteurs de cytotoxicité naturels (NCR) NKp30 NKp44 et NKp46 (122). Bien que les ligands de ces récepteurs ne soient pas clairement définis il semble que plusieurs molécules présentes sur des cellules tumorales ou infectées soient reconnues via ces récepteurs (123). Ils constituent de forts signaux activateurs et sont pour NKp30 et NKp46 exprimés par les NK même sans activation. Les cellules T CD8 cytotoxiques expriment d'ailleurs également ces récepteurs.

Bien que ces récepteurs activent les cellules NK, ils ne possèdent pas, à l'exception du CD16, de segments intracellulaires comportant de motifs d'activation d'immunorécepteurs basés sur une tyrosine (ITAM). Les NCR vont d'ailleurs pouvoir utiliser la portion interne du CD16 pour signaler ou la chaîne ζ du CD3 en utilisant ses motifs ITAM pour Nkp30 et Nkp46 (124). Nkp44 va lui utiliser la protéine d'activation DNAX (DAP) 12 comme adaptateur qui contient un motif ITAM pour signaler en se dimérisant (125). DAP12 est utilisé par de nombreux récepteurs NK pour transmettre le signal intracellulaire, les récepteurs de type immunoglobuline (Ig) des cellules tueuses (KIR) vont l'utiliser, ainsi que la famille de récepteur NKG2 pour leurs membres activateurs respectifs (126).

2.1.2.2. Les signaux inhibiteurs

Les ligands de stress non exprimés par les cellules saines et le besoin de plusieurs signaux d'engagement sont des bons moyens d'éviter une activation NK sur des cellules saines. Mais étant donné qu'une vaste partie des molécules reconnues par les récepteurs NK sont potentiellement présentes à la surface des cellules saines, il est important que l'activité lytique soit inhibée. L'inhibition des NK est en grande partie centrée autour des molécules du MHC. L'expression des molécules du MHC de classe I est un signal inhibiteur fort pour les NK (127). Ainsi les cellules tumorales perdant cette expression sont facilement détectées par les cellules NK. Bien que ce signal soit important il n'est pas le seul frein à l'activation, car certaines cellules saines ne l'expriment pas, comme l'ensemble des globules rouges (128).

Un récepteur majeur pour l'inhibition des NK est le récepteur NKG2A, qui se lie à l'antigène des leucocytes humains (HLA) E et se dimérise avec CD94, chaîne commune des récepteurs NKG2 (129). Cette dimérisation permet l'activation des deux motifs inhibiteurs d'immunorécepteurs basés sur la tyrosine (ITIM) qui permettent un signal rapide et fort en recrutant les phosphatases SHP-1 et SHP-2 (130).

Les récepteurs KIR se lient également aux molécules du MHC mais ils vont se lier aux molécules du HLA-C dans une majorité des cas ou aux types A ou B pour certains KIR (131, 132). Les KIR peuvent être activateurs comme vu précédemment mais une majorité des récepteurs décrits

aujourd'hui sont inhibiteurs (133). Il s'agit d'une famille de récepteurs composés de domaines de type Ig. Les gènes des KIR sont tous situés sur le chromosome 19 dans un segment de 150 kb et sont donc liés. Cela en fait un allogroupe qui se transmet en ensemble de gènes (134, 135). Ainsi tous les individus n'exprimeront pas les mêmes KIR, certains individus vont exprimer une majorité de KIR inhibiteurs alors que d'autres auront un grand nombre de KIR activateurs. De plus cette famille de gènes est hautement polymorphique, chaque KIR peut avoir un grand nombre de variant à travers la population, ce qui en fait un groupe de récepteurs complexes à étudier (135). Cette variation semble due à une coévolution des KIR avec les haplotypes du MHC, leurs ligands (134). Les mécanismes d'actions des KIR décrits sont similaires à NKG2A et CD94 (136).

2.1.2.3. L'intégration du signal

Pour organiser la réponse des cellules NK il faut que tous ces signaux soient mesurés et qu'il en ressorte un signal d'action pour que la cellule engage ses mécanismes de cytotoxicité ou non. Lors du contact avec une cellule, les NK vont former une synapse immunologique qui est organisée par une molécule centrale dans le processus de cytotoxicité, l'antigène associé aux fonctions lymphocytaires (LFA1). Cette molécule d'adhésion va lier la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM1) sur la cible et commencer l'organisation de la synapse (137). Les récepteurs vont alors interagir avec la cible en transmettant leurs signaux respectifs. LFA1, lorsqu'il est engagé, s'organise à la périphérie de la synapse et va réorganiser le cytosquelette d'actine. Une fois la synapse organisée et le cytosquelette d'actine prêt les divers récepteurs vont se regrouper en micro-regroupements pour transmettre leurs signaux respectifs (138, 139). La somme des signaux va ainsi transiter et recruter ou non les molécules qui vont guider les granules cytotoxiques vers la synapse. Le réseau de microtubules va se modifier pour amener les granules vers le réseau d'actine et permettre leur exocytose.

2.1.3. Les mécanismes de cytotoxicité

2.1.3.1. La dégranulation

Une fois activées, les cellules NK peuvent engager plusieurs voies de cytotoxicité pour éliminer les cellules cibles. La voie standard utilise les granules cytotoxiques contenant de la perforine et des granzymes. Ces granules sont guidés via le cytosquelette lors de la réorganisation cellulaire qui arrive après la décision cellulaire d'activation.

Ce processus passe par plusieurs étapes pour délivrer au bon endroit les granules cytotoxiques et les exociter face à la cible (figure 3). La première est liée directement aux complexes de la synapse immunologique formée avec la cible. Une fois le signal activateur de la synapse intégré par la NK il va y avoir polymérisation de filaments d'actine (140). Ces filaments vont aller lier les microtubules à proximité dans le cytoplasme (141). Ensuite LFA1 via sa liaison avec le cytosquelette d'actine va attirer le centrosome des microtubules vers la membrane en face de la synapse immunologique. Ce faisant les granules ont une voie tracée pour se diriger vers le bon endroit. Ils vont alors se polariser vers la synapse. Une fois polarisés correctement, les granules vont devoir quitter le réseau de microtubules pour aller fusionner avec la membrane où ils vont être guidés par le réseau d'actine présent à la synapse et par la myosine le long de ces fibres (142, 143). Une fois les granules assez proches de la membrane cytoplasmique, la dernière étape peut commencer, à savoir la fusion des membranes lysosomale et cellulaire pour que le contenu du granule soit relargué dans l'espace synaptique.

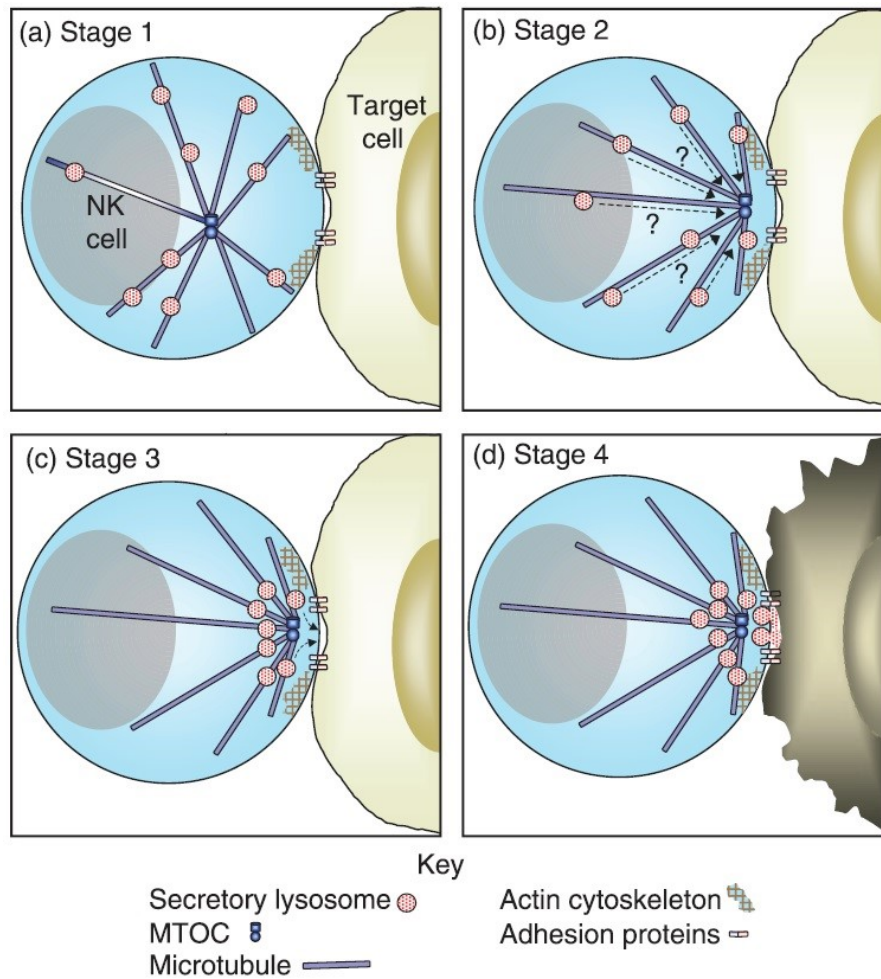


Figure 3. – Mécanisme de dégranulation

(tiré de Topham NJ, Hewitt EW. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger?
Immunology. ©2009;128(1):7–15 avec l'autorisation de John Wiley and Sons)

Les granules exocytés contiennent un cocktail de molécules cytotoxiques, les plus importantes étant la perforine et le granzyme B. La perforine est une protéine qui va s'ancrer dans les membranes de la cible pour se polymériser et générer ainsi des pores membranaires (144). Elle n'est active qu'une fois en présence d'ion calcium, donc une fois exocyté dans la synapse (145). Ceci a pour effet d'abolir l'intégrité membranaire et donc déclenche une catastrophe cellulaire. La polarité de la membrane est largement compromise et les ions peuvent alors se déplacer entre les compartiments extracellulaires et intracytoplasmiques. Ceci résulte en une lyse osmotique de la cellule cible.

Ces pores permettent aussi l'entrée de l'autre molécule centrale de la lyse, le granzyme B, et est donc synergique avec cette dernière. Le granzyme B est une protéase qui va cliver de nombreuses protéines dans la cellule cible, notamment les caspases, et donc déclencher la cascade de caspase qui mène à l'apoptose (146).

2.1.3.2. Les récepteurs de mort

L'autre voie utilisée par les NK pour tuer les cellules cible utilise des ligands qui vont activer des récepteurs de mort. Ces ligands principaux sont Fas-ligand (FasL), le facteur de nécrose tumorale (TNF) et le ligand inducteur d'apoptose lié au TNF (TRAIL). Une fois exposés par les NK ils vont lier les récepteurs de mort cellulaires présents sur la cible et activer leur polymérisation. On retrouve six récepteurs de mort : le récepteur au TNF (TNF-R1)(147), les récepteurs au TRAIL 1 (TRAIL-R1)(148) et 2 (TRAIL-R2)(149) et les récepteurs de mort (DR) 3 (150) et 6 (151). Ces récepteurs vont alors activer un domaine crucial qui leur est commun, le domaine de mort (DD) Ce segment une fois actif va lier la molécule adaptatrice associée à Fas à DD (FADD) (152, 153). C'est cette dernière qui va à son tour recruter les caspases 8 et 10 initiateuses de la voie de mort extrinsèque qui aboutit à l'apoptose de la cellule ciblée (Figure 4).

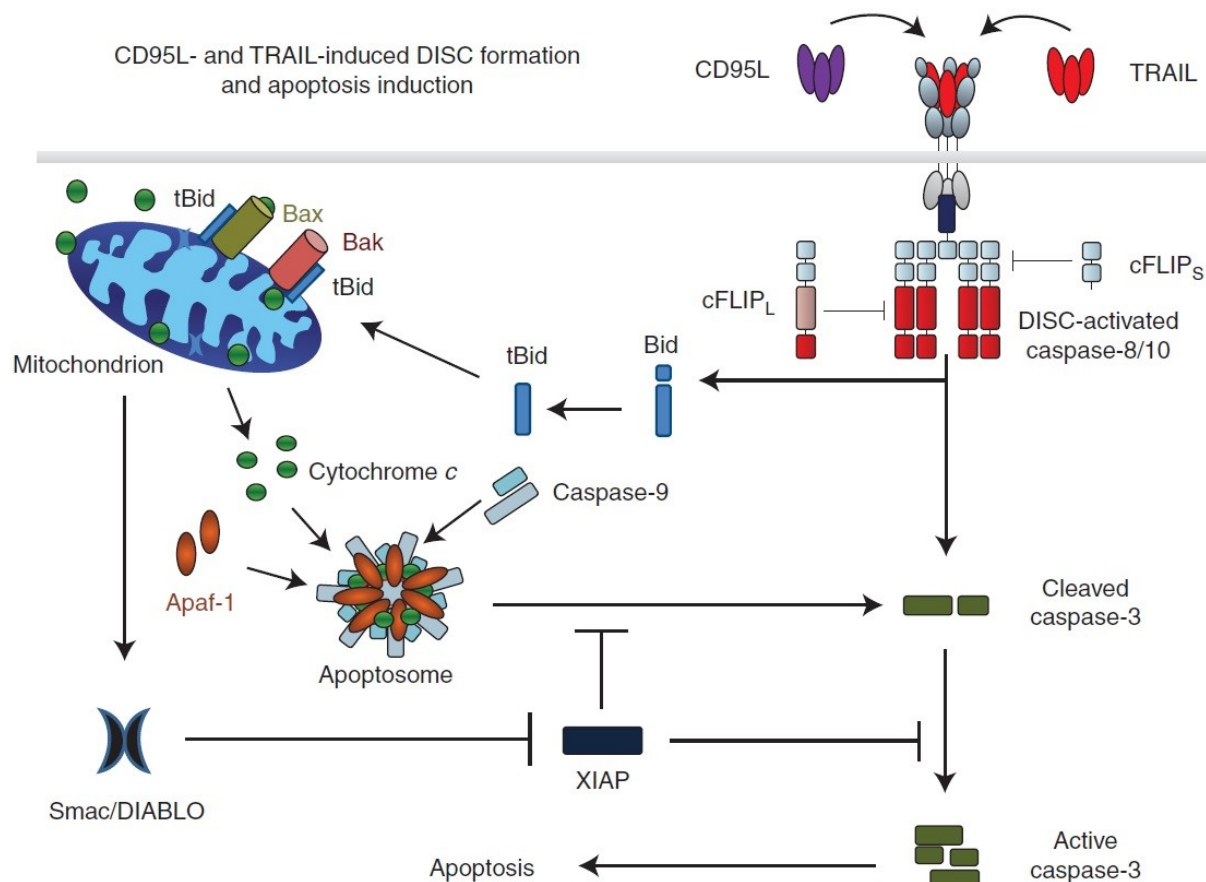


Figure 4. – Mécanismes d'induction de l'apoptose par les récepteurs de mort

(tiré de Walczak H. Death receptor-ligand systems in cancer, cell death, and inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. ©2013;5(5):a008698 avec l'autorisation de Cold Spring Harbor)

Ces processus, bien que complexes, sont très rapides et redoutablement efficaces pour détruire une cellule. Leur autre avantage est qu'ils permettent de ne tuer qu'une cellule spécifique et n'affectent pas les autres environnantes. Ainsi chaque cellule peut être analysée indépendamment par les cellules NK et leur surveillance permet de cribler un organe en éliminant uniquement les cellules cancéreuses ou infectées. Cet effet est issu d'un perfectionnement évolutif et semble parfait pour se débarrasser du cancer. Il est intéressant de le comprendre et de l'utiliser pour le mettre à profit en thérapie. Un tel effet surpasse très largement les traitements actuels de chimiothérapie car il est plus efficace et plus spécifique donc avec moins d'effets secondaires.

2.2. Les cellules T

Les lymphocytes T sont un autre type cellulaire aussi capable de détruire les cellules aberrantes. Ils sont au cœur de l'immunité adaptative car ils organisent toute la réponse immune autour de leur activation. S'ils ont un tel pouvoir, ils sont aussi très finement régulés et leur activation est un processus complexe qui empêche de déclencher une telle réponse lorsqu'il n'y en a pas besoin. L'activation T est centrée autour de leur récepteur, le récepteur des cellules T (TCR) qui est hautement variable et très spécifique et qui leur permet de réagir face à quasiment tous les pathogènes et cellules indésirables. Et les cellules cancéreuses ne font pas exception.

2.2.1. Le développement des cellules T

2.2.1.1. Développement dans la moelle

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) commencent le processus de différenciation dans la moelle en acquérant les premiers marqueurs des progéniteurs T tel que CD7, CD5 et CD1a (154, 155). Ce changement est orchestré par plusieurs signaux internes qui démarrent l'activation des facteurs de transcription qui permettent ce phénotype. Le signal Notch est central dans ce phénomène. Le ligand Delta 1 (DL1) se lie au récepteur Notch1 puis est clivé. Il y a alors translocation au noyau et activation des gènes régulés par Notch (156). Parmi les gènes cruciaux pour le développement T les facteurs de transcription GATA3 et le facteur de transcription 7 (TCF7) (157, 158). Suite à ce signal les cellules sont attirées dans le thymus pour entamer les premières étapes de recombinaison génétiques du TCR (159). A cette étape on parle de cellules Pro-T.

Ces progéniteurs vont alors entrer dans les divers compartiments du thymus et recevoir les signaux qui vont les faire progresser à travers les différentes étapes du développement T. Sans l'action de cet organe il est impossible de faire progresser les cellules vers un stade mature de cellules T(160).

2.2.1.2. Sélection thymique et recombinaison du TCR

En migrant dans le thymus les pro-T vont entamer leur différenciation en passant par le cortex thymique et devenir des cellules doubles négatives CD4 CD8 (DN). A ce stade les cellules vont commencer à exprimer des molécules de surface essentielles pour leur interaction avec le thymus et la transmission du signal de développement. Un des premiers marqueurs de surface apparaissant est le CD44. Cette molécule d'adhésion va permettre l'interaction correcte avec les cellules stromales thymiques et leur permettre de progresser dans le cortex thymique jusqu'à la région subcapsulaire (161, 162). A ce stade le signal cytokinique IL-2 passant par le récepteur CD25 joue un rôle crucial pour permettre aux cellules de passer les étapes et pouvoir commencer le réarrangement génétique du TCR (163, 164). Il y a donc expression du CD25 puis le début du réarrangement du locus de la chaîne β qui va permettre l'expression du pre-TCR pour arriver au stade DN3 (Figure 5) (165). Pour recombiner précisément les segments du TCR les thymocytes expriment alors les recombinaisons RAG1 et RAG2 qui vont exciser les portions géniques entre certains segments V, D et J (166-168). Après perte de l'expression de CD25 les thymocytes vont passer au stade DN4 et proliférer puis quitter la zone subcapsulaire du thymus, ils vont alors acquérir l'expression de CD4 et CD8 pour passer au stade double positif (DP) et réarranger le locus de la chaîne α du TCR. A ce moment les recombinaisons RAG sont réexprimées temporairement pour recombiner la chaîne α (166). La maturation se termine et les thymocytes vont devenir des cellules T simple positives CD4 ou CD8 (Figure 5).

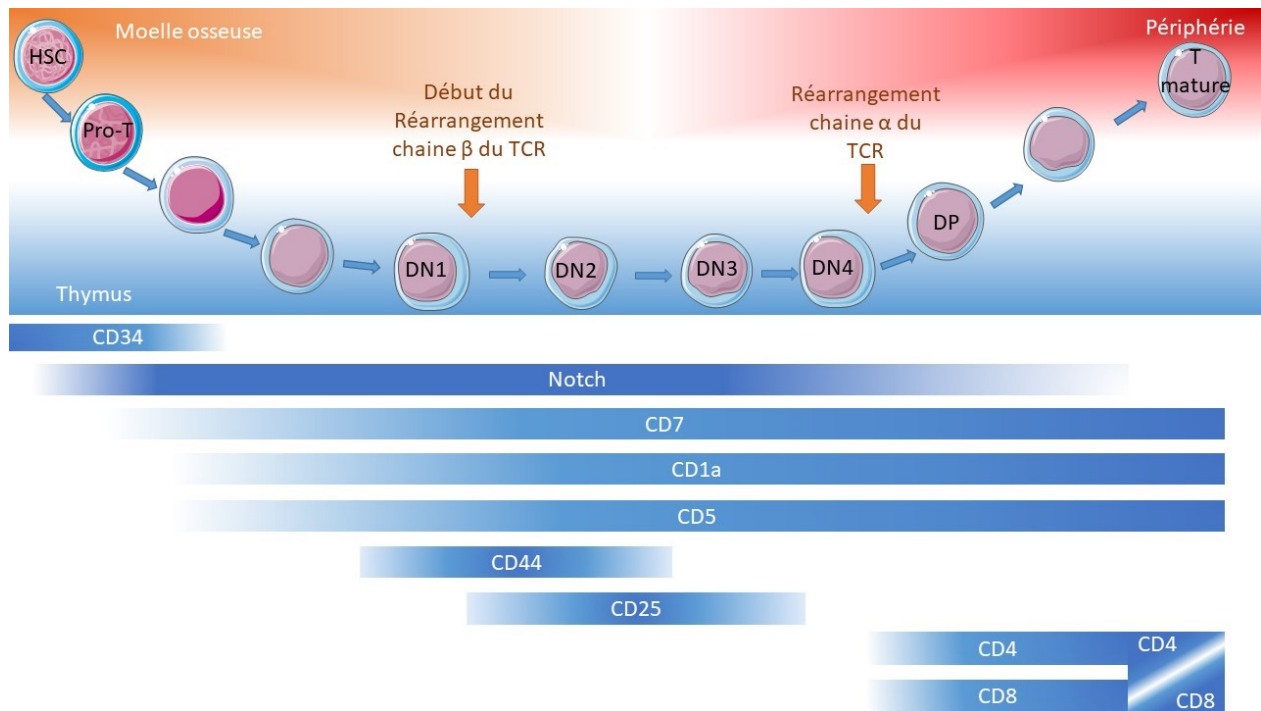


Figure 5. – Développement T et marqueurs associés

(créé avec Servier Medical Art, license Creative Common Attribution 3.0 Generic License.

<http://smart.servier.com/>)

Une fois le TCR réarrangé et exprimé à la surface, les thymocytes vont passer par les étapes de sélection positive puis négative. Pour devenir simple positifs les lymphocytes T doivent engager leur TCR avec des molécules du MHC présentes sur les cellules stromales du thymus. Sans ce contact ils ne reçoivent pas de signal de survie et vont donc entrer en apoptose (169). Selon l'interaction avec un MHC de classe I ou de classe II, les T vont devenir respectivement des simples positifs CD8 ou CD4 (170). Dans le cas où l'affinité de liaison entre le TCR est trop faible le signal n'est pas transmis correctement et ne permet pas de faire survivre les cellules T, à l'inverse il serait dangereux que l'affinité soit trop forte car il pourrait y avoir engagement de l'interaction TCR-MHC sans la présence d'antigène ou de manière non spécifique.

Une fois la sélection positive passée, les cellules T, bien que potentiellement fonctionnelles, ne vont pas rejoindre la circulation et doivent d'abord passer la sélection négative. Durant ce processus les cellules épithéliales thymiques vont réexprimer une grande variété de protéines normalement

spécifiques de certains tissus (171). Ils vont alors présenter des peptides du soi à leur surface et si l'interaction avec le TCR résulte en une reconnaissance les cellules sont éliminées (172-175).

Ce processus complexe est nécessaire pour assurer un fonctionnement correct du compartiment T. Sans ce processus, ou s'il est dysfonctionnel, on retrouve des problèmes immunitaires ou des réactions autoimmunes. En effet, en laissant se développer et maturer des clones autoréactifs il peut y avoir de graves lésions dues à une activation des cellules T contre des antigènes du soi

2.2.2. La fonction des cellules T

En périphérie les cellules T vont avoir un rôle clé dans la réponse aux pathogènes. L'immense variabilité du TCR permet au système immunitaire de reconnaître la quasi-totalité des pathogènes et organismes invasifs. Mais pour initier la réponse T il faut une présentation par les molécules du MHC d'un peptide qui va lier le TCR et des signaux de co-stimulation.

2.2.2.1.L'activation des cellules T

Une réponse typique de cellule T utilise d'abord un signal primaire via le TCR. L'affinité du TCR pour un complexe MHC chargé avec un peptide va lui permettre de se lier par les segments α et β à ce dernier (176). Il est donc crucial pour l'activation des cellules T d'avoir l'appui de cellules présentatrices d'antigène. En se liant, les complexes TCR vont générer un micro-agrégat et permettre aux segments internes du TCR d'être phosphorylés (177). Les portions ITAM vont alors recruter des kinases ZAP70 et Fyn (178-180). En parallèle, les corécepteurs CD4 ou CD8 vont recruter la protéine tyrosine kinase spécifique aux lymphocytes (Lck) cruciale pour un signal correct (181, 182). Ces corécepteurs ne sont encore une fois fonctionnels que lors de l'interaction avec un MHC présentant l'antigène, car ils interagissent avec d'autres portions du complexe indépendamment du peptide chargé (183, 184). Une fois ces corécepteurs et toutes les kinases recrutés dans les micro-agrégats, le signal primaire est alors actif. Pour que les signaux soient suffisants il va y avoir un signal secondaire via l'interaction de corécepteurs activateurs tels que

CD28 (185). Il va y avoir alors activation du complexe liant pour l'activation des cellules T (LAT), notamment de la PLC γ et du facteur de croissance lié au récepteur (GRB) 2, qui va enclencher la cascade de signalisation via le clivage du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) et par une entrée de calcium (186-189). La cellule T va recevoir suite à cette activation trois signaux majeurs : Un signal mitotique par la voie des protéines kinases activées par mitogène (MAPK), un signal transcriptionnel via la voie du facteur nucléaire κ B (NF κ B) et un signal activateur qui va enclencher les fonctions T via le facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT) (190-193).

Cette activation est très complète et extrêmement forte. De plus, les cellules T étant au cœur des réactions immunitaires elles vont, via leur production de cytokines, déclencher une réaction inflammatoire globale qui va recruter d'autres cellules. D'abord, des cellules T supplémentaires qui vont permettre soit une amplification de la réponse via les cellules CD4 ou bien une cytotoxicité directe en recrutant des lymphocytes T cytotoxiques CD8 (CTL) (194). En effet, les CTL sont capables d'utiliser les mêmes mécanismes de cytotoxicité que les cellules NK. Ils vont se polariser pour dégranuler et peuvent exprimer des ligands des récepteurs de mort comme décrit plus haut. Les cellules myéloïdes sont elles aussi attirées suite à cette réponse, une forte inflammation va avoir pour conséquence l'arrivée de nombreux monocytes qui vont se différencier une fois sur place en macrophages et phagocyter les pathogène ou les cellules cancéreuses (195). Les cellules B interagissent également avec les lymphocytes T et participent à la réaction immunitaire, leur stimulation peut aboutir à la sécrétion d'anticorps dirigés contre les cibles des T (196). Tous ces effets montrent à quel point les cellules T sont centrales dans la réaction immunitaire.

2.2.2.2.L'inhibition des cellules T

Étant donné le potentiel des cellules T, leur activation est finement régulée. Par exemple, comme énoncé plus haut cette activation est dépendante de l'interaction avec une cellule présentatrice d'antigène qui doit donner plusieurs signaux. Dans le cas du cancer, les APC vont rarement infiltrer la tumeur et présenter un antigène tumoral. S'il y a bien des cellules immunitaires dans les sites tumoraux, l'environnement ne favorise pas leur action, le microenvironnement tumoral favorise la présence de cellules immunosuppressives (197). Via la sécrétion de cytokines comme l'IL-10 les tumeurs vont inhiber les cellules dendritiques (198, 199). L'hypoxie et les métabolites favorisent

les macrophages de type M2 immunomodulateur (200, 201). Ainsi la présentation d'antigène n'est pas favorisée et donc ne permet que difficilement d'obtenir une réponse T complète.

Dans le cas d'une activation conventionnelle, les cellules T doivent pouvoir être inhibées pour terminer la réaction immunitaire. En effet, il semble logique que des mécanismes d'inhibition bloquent la réaction inflammatoire envers des cellules saines. C'est donc par l'expression de ligands liant des récepteurs inhibiteurs que les cellules vont renvoyer aux cellules T un signal négatif. Ces récepteurs sont nombreux et vont avoir des mécanismes d'action variés mais souvent visant le signal du TCR ou des costimulateurs. On note parmi les principaux, le récepteur de mort programmée 1 (PD1) et l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA4) qui sont plus vastement caractérisés. Lorsque ces phénomènes sont déficients en dehors du contexte du cancer on observe une réaction auto-immunitaire qui peut être très dangereuse pour l'individu (202-205).

C'est donc via la modulation du signal par des récepteurs inhibiteurs que les cancers vont aussi empêcher que les cellules T s'activent à leur contact. Malgré une potentielle stimulation via le TCR et des signaux de costimulation, des récepteurs inhibiteurs peuvent être engagés par les cellules cancéreuses pour envoyer des signaux pro-apoptotiques et inhibiteurs. Ces signaux vont alors contrer l'activation potentielle et enclencher une contraction des cellules T activées (206-208).

La cellule T, tout comme les cellules NK, intègre tous ces signaux de manière concomitante et c'est donc la somme de ces messagers secondaires qui va déterminer le comportement des cellules T. Dans un contexte aussi peu favorable à l'activation, il est d'ailleurs possible que les cellules T adoptent un phénotype régulateur. Ce sont des cellules T qui, à l'inverse des cellules T conventionnelles, vont avoir un effet anti-inflammatoire en réponse à l'engagement de leur TCR contribuant ainsi à maintenir d'autant plus un microenvironnement tolérogène (209-211).

De manière générale le développement d'un cancer implique que celui-ci développe des mécanismes qui lui permettent d'échapper à l'action du système immunitaire. Comme vu plus haut l'action cytotoxique des cellules NK ou des cellules T CD8 est difficilement évitable en tant que telle. Si les voies des récepteurs de morts peuvent être altérées (212, 213), les granules cytotoxiques et les pores membranaires qu'ils forment sont un formidable outil qui ne peut être contré. Le cancer se développe ainsi, non pas en devenant résistant à la lyse par les cellules NK ou T, mais en

empêchant les cellules cytotoxiques de s'activer soit en diminuant les signaux et synergies cellulaires de l'activation, soit en mettant en place des stratégies d'inhibition de la réponse immune.

2.3. L'immunoédition et l'évasion tumorale

Le cancer lorsqu'il se développe va, comme vu précédemment, acquérir des mutations pour d'abord dépasser les points de contrôle ADN et du cycle cellulaire, puis augmenter sa capacité invasive. Mais une fois une masse critique atteinte, il va rentrer en contact avec le système immunitaire et va donc en temps normal être attaqué. L'effet du système immunitaire va alors agir comme une pression de sélection environnementale sur le cancer (214, 215). C'est donc en s'adaptant à cette pression que le cancer va pouvoir progresser. Les changements imposés au cancer par le système immunitaire sont regroupées sous le concept d'immunoédition. Cette immunoédition peut regrouper de nombreux mécanismes dits d'évasion. C'est seulement en mettant en place ces mécanismes que le cancer peut se développer et en ce sens l'immunoédition est un point clé qui doit être compris mais qui pourrait aussi être la clé de l'élimination du cancer.

2.3.1. La régulation du MHC

Comme vu précédemment deux types de cellules vont avoir un effet direct sur le cancer en le détruisant, d'un côté les cellules NK qui vont intégrer des signaux de stress via les molécules de surface et de l'autre les lymphocytes T qui vont utiliser la reconnaissance TCR pour détecter les anomalies cellulaires via le MHC.

Un premier mécanisme d'évasion du cancer est la perte ou la diminution de l'expression du MHC pour éviter la reconnaissance des T cytotoxiques. En diminuant la présence en surface, la probabilité d'activer les cellules T diminue. L'abolition complète empêche la fixation du TCR et donc son engagement. Étant le signal majeur d'activation des CTL, sans ce signal le cancer peut éviter d'être reconnu (216, 217). Mais la simple diminution peut être tout aussi efficace (218). Comme on l'a vu précédemment, c'est l'intégration de la somme des signaux qui permet à la cellule

T de s'engager. Donc, en diminuant la densité de complexes pouvant se former à la synapse, le signal peut ne pas être suffisant même si il y a reconnaissance et interaction (219). Pour former des micro-agrégats qui vont permettre de réellement déclencher la cascade d'activation des T il faut un minimum de molécules.

La diminution de densité est d'ailleurs plus fréquemment observée que la disparition complète du MHC (220-222). Ceci est dû à un mécanisme évolutif intéressant, la perte de l'expression du MHC est un signal très fort d'activation NK (218). Comme vu précédemment, l'inhibition NK est centrée autour des molécules du MHC, ainsi si la cellule cancéreuse n'exprime plus de MHC toute l'inhibition des NK qui en découlait est levée et la cellule va donc s'activer et détruire la cellule cancéreuse. Bien que la perte de MHC soit un signal majeur d'activation pour les NK il est possible que d'autres signaux inhibent la lyse. Il est possible d'observer l'apparition de molécules de MHC non conventionnelles qui ne seront pas en mesure d'activer les cellules T mais qui sont des signaux inhibiteurs NK, tel que le HLA-E (223, 224).

Cette double reconnaissance est un mécanisme particulièrement efficace, car la lyse par les NK empêche l'apparition de clones perdant l'expression du MHC d'un côté et de l'autre les cellules T vont reconnaître les cellules présentant des peptides aberrants. Pour que les clones cancéreux se développent, il faut donc souvent qu'ils fassent varier leur niveau de MHC sans l'abolir complètement ou en activant d'autres types d'inhibition NK, acquérant donc un équilibre d'expression du MHC.

2.3.2. La perte de ligands activateurs

S'il est possible d'observer une baisse de niveau de MHC, qui va potentialiser l'activation NK, il est aussi possible pour la tumeur d'inhiber sa production de ligands activateurs. Ainsi, même sans signaux inhibiteurs, si la cellule NK ne peut pas engager ses récepteurs activateurs, le niveau global de signaux restera faible et l'intégration des signaux ne déclenchera pas de lyse de la cellule cible. Par exemple, l'expression de MIC-A et MIC-B qui résulte normalement du stress cellulaire et qui est un signal fort d'activation via NKG2D peut être inhibé et un clone qui n'exprime pas ces molécules à sa surface peut être sélectionné via la pression des NK (225, 226). Il a aussi été reporté

que le B7-H6, ligand de Nkp30 est diminué à la surface de certaines tumeurs notamment via des métalloprotéases qui le dégradent à la surface, empêchant ainsi l'interaction avec ce récepteur (227).

D'autres stratégies, qui n'impliquent pas forcément la perte d'expression des ligands des récepteurs activateurs, vont résulter au même effet en bloquant leur interaction à la surface des cellules ou en inhibant leur fonction. Par exemple, la Galectine 3 se lie à Nkp30, mais au lieu d'activer les NK comme ses ligands classiques, elle va biaiser son signal vers un effet inhibiteur (228). De même, il est possible pour la cellule cancéreuse d'inhiber l'activité de ces récepteurs activateurs, ainsi, même si le ligand est toujours présent, la cellule immunitaire ne recevra pas de signal d'activation. La sécrétion de facteur de croissance tumorale β (TGF β) a été montrée comme biaisant les récepteurs aux chimiokines des NK (229).

2.3.3. La sécrétion de cytokines

Nous l'avons vu précédemment lors de la formation tumorale, les cytokines pro-inflammatoires ont tendance à favoriser l'apparition de cancer. Mais elles vont aussi favoriser l'activation immunitaire envers ce cancer. C'est une double action qui peut sembler paradoxale. Ainsi les cellules cancéreuses peuvent, une fois la tumeur établie, sécréter des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 localement pour inhiber le système immunitaire (198, 230).

Un autre aspect de la sécrétion de cytokine n'est pas directement lié aux cellules cancéreuses mais à toute la population qui les accompagne. En effet, une fois qu'une masse tumorale est mise en place, la néo-vascularisation qu'elle va favoriser guide aussi en son sein un vaste panel de cellules. Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) sont naturellement attirées vers ces lieux de régénération et elles vont ainsi être incorporées au tissu tumoral (197). Il se trouve que ces MSC ont un fort pouvoir immunomodulateur. Via l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui va générer certains métabolites, les MSC sont capables d'inhiber la prolifération T (231). Mais elles vont aussi altérer les autres cellules les rendant tolérogéniques, leur production de lactate va par exemple faire passer les macrophages d'un phénotype pro-inflammatoire (M1) à un phénotype immunomodulateur (M2) (200). Les macrophages intratumoraux sont d'ailleurs souvent de type

M2 aussi à cause de l'environnement hautement hypoxique de la tumeur (232, 233). Ces macrophages vont donc aussi sécréter des cytokines anti-inflammatoires (234). On retrouve donc au niveau global de la tumeur un environnement qui va avoir un profil cytokinique défavorable à l'action antitumorale du système immunitaire.

2.3.4. L'augmentation des ligands inhibiteurs

En temps normal l'activation et la prolifération des cellules T doit être contrôlée pour éviter l'auto-immunité. C'est notamment via les récepteurs inhibiteurs que la contraction est médiée et que les cellules réactives sont éliminées (235). Les ligands de ces récepteurs sont naturellement présents sur les cellules des ganglions lymphatiques (236). L'expression anormale de ces ligands sur les cellules cancéreuses confère un avantage majeur, les protégeant de la lyse par le système immunitaire.

On retrouve un très vaste panel de ligands inhibiteurs. Nous avons déjà évoqué les molécules non classiques de MHC qui vont se lier aux KIRs inhibiteurs sur les cellules NK. Mais on retrouve des voies de signalisations différentes qui vont médier un signal indépendant. Un des récepteurs inhibiteurs clé est PD-1, qui va à lui seul déclencher une inhibition des cellules T et une apoptose (237). L'activation de PD1 va bloquer, via les phosphatases SHP1 et SHP2, les signaux activateurs du TCR et des corécepteurs en contrant l'action des kinases liées au TCR comme ZAP70 et en bloquant la PI3K (238, 239). Mais l'activation de PD1 va aussi avoir un effet direct sur la survie cellulaire. En effet, l'arrêt brusque des signaux va bloquer la production de cytokines, le cycle cellulaire et la production de facteur de survie Bcl-Xl (240-242). On retrouve l'expression du ligand de PD1 (PDL-1) sur un grand nombre de cancer car l'avantage conféré par une telle expression est majeur vu la force de l'inhibition des cellules T.

D'autres récepteurs inhibiteurs ont un impact important sur la réponse T. CTLA4 est un corécepteur inhibiteur qui a la particularité de se lier au CD80 le ligand de CD28. Ayant une plus grande affinité que CD28 pour ce ligand, CTLA4 va séquestrer CD80 et donc empêcher le signal co-activateur de CD28 mais aussi s'activer et transmettre un signal inhibiteur par lui-même (208, 243). Sa portion intracellulaire va, comme PD1, elle aussi recruter la phosphatase SHP2 qui va éteindre les signaux

du TCR et les cascades des corécepteurs. On retrouve un grand nombre de ces récepteurs inhibiteurs parmi lesquels le gène d'activation des lymphocytes 3 (LAG3), la protéine à domaine mucine et immunoglobuline des cellules T 3 (TIM3) ou 2B4 (CD244) (246). De manière générale l'expression de tous ces récepteurs est un phénotype associé à une fonction T diminuée et les cancers ont tendance à exprimer les ligands de ces récepteurs, profitant ainsi que l'activation chronique des cellules T qui les rend plus sensibles à ces voies de signalisation.

2.3.5. Blocage des interactions et de la formation de la synapse

Toujours dans l'objectif de ne pas être reconnu par les cellules immunitaires, les cellules cancéreuses peuvent, non pas réduire leur expression de ligands activateurs du système immunitaire, mais les masquer à la surface. Ainsi, il a été démontré que les enzymes ajoutant des groupements de sucres aux protéines de surface peuvent être surexprimées et ainsi favoriser un patron de modification post-traductionnels aberrant. De ce fait, des ligands tels que les ligands de NKG2D peuvent ne plus être reconnus, bloquant ainsi ce signal activateur aussi bien qu'en ayant une diminution d'expression (247). Les molécules d'adhésions sont aussi affectées par ce type de modification, et il peut y avoir une fixation des lectines de type immunoglobuline liant l'acide sialique (Siglec) présents à la surface des cellules immunitaires sur la cellule cancéreuse (248). Ces molécules d'adhésion ont tendance à renvoyer un signal inhibiteur qui va encore une fois jouer en la faveur de la cellule cancéreuse en diminuant le niveau global d'activation des NK ou CTL rentrant en contact.

De plus, l'inhibition d'interaction peut se faire à une échelle plus vaste en inhibant la formation de la synapse immunologique elle-même. Les mécanismes ne sont pas encore clairs mais la probabilité de formation de synapse avec certains cancers semble réduite (249, 250). Il semble que certaines molécules d'adhésions puissent jouer un rôle dans ce phénomène. La mucine MUC16 a été décrite pour inhiber la formation de synapse avec les cellules NK et donc la lyse liée à ceux-ci sans impacter les voies d'activations (251). En inhibant la formation des synapses, même si les cellules immunitaires seraient prêtes à s'activer, il ne peut y avoir une organisation tridimensionnelle correcte et donc une polarisation et une dégranulation.

Tous ces mécanismes peuvent apparaître progressivement au fur et à mesure de l'accumulation des mutations du cancer. On peut en retrouver plusieurs sur un même clone tumoral et c'est généralement la synergie entre tous ces mécanismes qui fait que le cancer échappe à la surveillance immunitaire. Paradoxalement, c'est l'action des cellules immunitaires qui force ces caractères à apparaître, en éliminant les cellules qui ne les ont pas, une sélection naturelle se fait pour un clone cancéreux particulièrement résistant. C'est par ce constat et ce concept de défaut d'activation immunitaire que les premières immunothérapies ont été développées. Chacun des points évoqués ici a été la cible de nouvelles approches pour restaurer l'immunité anti-tumorale en venant altérer les interactions entre le cancer et les cellules immunitaires.

3. L'immunothérapie

Le concept de l'immunothérapie est de bousculer les conditions de pression de sélection immunitaires. En changeant de manière abrupte l'environnement le cancer n'a pas le temps de s'adapter et est alors éliminé par le système immunitaire. Chacun des points évoqués plus haut peut être ciblé, l'immunothérapie vise donc à contrecarrer les systèmes d'évasion.

La première immunothérapie est en fait tout simplement la greffe de moelle osseuse allogénique (252). Dans un contexte de rechute chronique, la greffe de moelle est indiquée (253). L'effet recherché ici est en fait un effet secondaire de la greffe, l'effet du greffon contre l'hôte (GvH) qui va faire que le système immunitaire greffé va attaquer l'hôte dans lequel il se trouve par simple réaction allogénique. Bien que cet effet soit extrêmement dangereux et qu'il doit absolument être contenu avec des immunosuppresseurs, en laissant suffisamment d'effet GvH on observe un effet plus prononcé en direction des cellules cancéreuses. C'est l'effet du greffon contre la leucémie (GvL) (254). Dans ce cas on utilise donc le système immunitaire et sa capacité à cibler préférentiellement les cellules tumorales pour éliminer la leucémie alors qu'il va tolérer l'hôte.

3.1. La greffe de cellules moelle osseuse ou greffe de HSC

C'est dans le contexte de la leucémie que la première greffe de moelle osseuse fut réussie en 1956 en utilisant comme donneur le jumeau du patient (255). Ce cas particulier d'individus génétiquement identiques a ouvert la voie à une pratique qui, encore aujourd'hui et dans certains cas le seul traitement disponible. Encore aujourd'hui, la greffe de moelle est indiquée pour le traitement de leucémies résistantes aux chimiothérapies.

La greffe de moelle osseuse consiste, après un conditionnement, un fort bolus de chimiothérapie qui va vider les niches de la moelle osseuse et éviter le rejet du greffon par le système immunitaire du receveur, à infuser des cellules souches hématopoïétiques pour qu'elles prennent la place dans ces niches, reconstituant ainsi un nouveau système immunitaire (256).

En lui-même ce bolus de molécules ayant pour objectif de dépléter la moelle du patient va avoir un effet sur la leucémie. Le conditionnement va diminuer drastiquement la charge tumorale, facilitant la thérapie (257). Les cellules du donneur sont alors infusées et vont se nicher dans la moelle du receveur. Progressivement les cellules souches vont proliférer et se développer pour générer des cellules hématopoïétiques matures.

3.1.1. Les NK dans la greffe de moelle

Après la greffe les cellules NK réapparaissent rapidement, bien avant les lymphocytes T (258, 259). Bien qu'indépendantes de la reconnaissance via le MHC, leur inhibition est basée sur celui-ci. Il est donc logique qu'elles aient un impact direct sur le cancer car les KIR, hautement polymorphiques, ne vont plus interagir avec les mêmes MHC. On parle de mésappariement des KIR qui va favoriser l'activation des NK (260). Comme vu plus haut, en diminuant le nombre d'interactions possibles pour le cancer, d'inhiber les NK la somme des signaux va être favorable à l'activation et l'action anti-tumorale sera donc supérieure à celle des NK autologues.

3.1.2. Les T dans la greffe de moelle

Les cellules T découlant de la différenciation des HSC nouvellement greffées mettent plusieurs mois, voire plusieurs années à réapparaître (261, 262). Il faut en effet que le réservoir de cellules T soit régénéré *de novo* via les processus décrits plus haut. Chez l'adulte, le thymus étant atrophié, il faut du temps à ce dernier pour rétablir une fonction suffisante pour permettre la repopulation des cellules T. Pendant ce laps de temps, la fonction T est maintenue par les cellules T matures présents dans le greffon, bien qu'imparfaite, cette fonction permet de maintenir l'immunité (263, 264).

Ce sont ces cellules T qui vont avoir un effet anti-tumoral. Ces cellules vont s'activer au contact des tissu du receveur, c'est l'effet GvH aigue. En diminuant le niveau global d'activation il n'est pas possible pour les T de générer une réaction allogénique forte, cependant un effet bénéfique contre la leucémie peut toujours être observé (266, 267). C'est l'effet GvL. Étant donné le niveau d'activation que la leucémie va provoquer via les marqueurs de stress potentiels, la réaction des cellules T va être plus prononcée qu'envers les cellules saines qui vont avoir un profil d'expression moins immunogène (268). Il est donc très important de doser l'immunosuppression après une greffe pour préserver cet effet GvL, tout en minimisant la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD).

Une fois la population de nouvelles cellules T matures rétablie, la réaction normale des cellules T sera de rejeter les cellules de l'hôte c'est l'effet du greffon contre l'hôte (GvH) chronique, il faut donc intervenir pour inhiber cette GvH. En donnant des médicaments immunosuppresseurs on diminue le niveau d'activation global pour empêcher la GvHD (265).

La greffe de HSC utilise le premier point vu sur l'immunoédition, à savoir l'interaction avec le MHC. L'inhibition produite par ce dernier est largement réduite, notamment à cause des récepteurs inhibiteurs NK, les KIR qui ne vont plus être en adéquation avec les génotypes de MHC du patient et ainsi permettre un niveau basal d'inhibition diminué (269). Mais aussi, via la réaction allogénique qui est engagée par les T matures qui vont s'activer en réponse à une liaison à un MHC qui n'est pas parfaite (270). Étant éduqués avec des APC issues du greffon, ils vont percevoir le MHC du receveur comme étranger et s'activer pour le détruire (271). On retrouve ici deux types d'interactions entre les cellules T et les APC qui vont engendrer des effets similaires mais d'une intensité différente. Les APC du receveur en interagissant avec les cellules T du donneur vont

déclencher une réaction intense qui est centrale dans la GvHD aigue, on parle d'alloréactivité directe. À l'inverse les APC et cellules T d'une même origine peuvent monter une réaction contre des cellules allogéniques, en l'occurrence ici celles du receveur, c'est une réaction allogénique indirecte. Cette réaction peut être moins intense et va plus se produire dans les phases chroniques de GvHD. Si ces mécanismes peuvent être néfastes par leur effet GvH ils sont aussi intéressants dans le contexte du traitement de la leucémie car ils vont pouvoir produire l'effet GvL recherché (272).

Le concept de la greffe de HSC est de changer drastiquement l'environnement immunitaire de la leucémie pour qu'une nouvelle pression de sélection se fasse de manière brusque sans laisser de temps à la leucémie pour se réadapter en acquérant de nouvelles mutations. Cependant l'immunosuppression et le délai pour la réapparition des cellules T peut laisser assez de temps pour sélectionner un clone malin résistant même dans ce nouvel environnement. On observe donc un nombre conséquent de rechutes (273).

3.1.3. Les désavantages de la greffe de moelle

En dehors de cette problématique de rechute, le traitement en lui-même nécessite d'avoir à disposition un donneur compatible. Il n'est possible que dans 30% des cas de trouver un donneur compatible dans la famille du patient, forçant ainsi à se tourner vers les banques de donneur. Ces banques permettent de trouver un donneur dans 30 à 40% des cas, laissant donc un grand nombre de patient inéligible à la greffe de HSC compatibles (274, 275). Il est donc important d'avoir des banques de donneurs suffisamment vastes pour dépasser ces problèmes de donneurs. La mise en place et l'entretien de ces structures peuvent être coûteuses et il reste difficile pour certains groupes ethniques peu présent dans ces banques d'avoir un donneur. Il reste possible alors de se tourner vers d'autres sources de cellules souches comme le sang de cordon ombilical ou des donneurs partiellement compatibles (276).

Un autre aspect est que même dans le cas où le traitement par greffe de HSC fonctionne et élimine définitivement l'entièreté des clones malins, il reste en lui-même une menace pour la santé du patient. En effet le potentiel de la GvHD est constant. On estime que malgré les précautions prises

presque la moitié des patients ayant subi une greffe de moelle mourront d'une cause non-reliée à une rechute de leucémie (277, 278). La GvHD est responsable d'un grand nombre de ces décès. On retrouve deux phénomènes distincts regroupés sous ce terme. La GvHD aigüe survient souvent dans les 3 premiers mois et va être une attaque rapide de multiples tissus. On note souvent une atteinte de la peau, du foie, du système digestif et du compartiment hématopoïétique. Il faut alors traiter le patient avec une forte immunosuppression qui peut abolir l'effet GvL (279, 280). La GvHD chronique est un effet moins intense qui s'établit progressivement. Elle peut toucher tous les organes et a un effet similaire à une maladie auto-immune. Si les effets sont moins spectaculaires c'est pourtant cette forme de GvHD qui est responsable de la majorité des décès non reliés aux rechutes (281).

L'immunosuppression, bien que modulable, a le désavantage de laisser le patient très vulnérable aux diverses infections opportunistes. Certaines infections qui devraient être bénignes comme l'infection du cytomégalo virus (CMV) ou des infections fongiques pulmonaires comme les aspergilloses peuvent devenir un véritable problème (282-284). Même si elles peuvent être soignées, à répétition ces infections peuvent finir par déclencher divers troubles sur le long terme.

Il est encore une fois ici preuve que les traitements actuels de la leucémie sont largement imparfaits. La greffe de moelle ne peut garantir la guérison et impact grandement la santé globale des patients. La qualité de vie des patients greffés est elle aussi largement affectée.

3.2. Les traitements cytokiniques

Après la découverte de l'effet anti-tumoral de l'interféron- α (IFN- α) l'idée d'utiliser un pulse exogène de cytokines pour traiter le cancer s'est progressivement mise en place (285, 286).

Les cytokines peuvent être injectées par voie intraveineuse pour une action globale de stimulation systémique des cellules immunitaires. Elles vont avoir un grand nombre d'effets sur les cellules du système immunitaires. Dans le cas du cancer, les cibles préférentielles pour avoir un effet anti-tumoral seront encore une fois les cellules T et NK. Ce sont donc logiquement les cytokines importantes pour leur activation qui ont été testées dans ce domaine.

3.2.1. L'interféron- α

La première cytokine testée dans la thérapie contre le cancer était l'interféron α . Cette cytokine est produite massivement lors d'une infection virale. Elle va stimuler les cellules immunitaires via les récepteurs à l'interféron α et β (IFNAR) 1 et 2 qui vont envoyer un signal via les kinases Jak1 et la tyrosine kinase 2 (TYK2) et engager les seconds messagers STAT1 et STAT2 qui vont faire proliférer la cellule et engager les voies d'activation (287, 288). En lui-même, l'IFN- α a aussi un effet anti-tumoral. De fortes doses d'IFN- α vont bloquer la néo-vascularisation et donc empêcher l'apport de nutriments aux sites tumoraux (289, 290).

Cependant l'injection systémique d'IFN- α provoque de nombreux effets secondaires liés à l'activation généralisée du système immunitaire. On recense des atteintes hépatiques, hématologiques, gastrologiques et même neurologiques, empêchant d'utiliser des doses d'IFN- α systémiques trop élevées (291, 292). C'est une problématique, car pour obtenir un effet bénéfique la dose nécessaire est importante car il faut maintenir l'action de l'interféron malgré sa demi-vie très courte (2,5h). En utilisant des modifications chimiques comme l'addition de groupements polyéthylène-glycol (PEG), ou en le fusionnant avec l'apolipoprotéine A1, il est possible de stabiliser cette cytokine cependant cette modification peut affecter son efficacité (293, 294).

De manière générale l'IFN- α , bien qu'intéressant, est peu utilisé à cause de sa pharmacodynamique. En utilisant des injections sous-cutanées, la diffusion plus lente permet une meilleure biodisponibilité et permet une utilisation de doses plus élevées compatibles avec un traitement. Actuellement, plus que comme traitement unique, l'IFN- α est plutôt envisagé comme adjuvant à d'autres immunothérapies, potentialisant leur effet.

3.2.2. L'Interleukine-2

L'IL-2 est une cytokine clé dans la biologie des cellules NK et T, elle est essentielle pour les cultures *in vitro* de ces cellules (295, 296), et au vu de l'impact de ces cellules sur le cancer il est

logique de penser à l'utilisation de cette cytokine comme traitement anti-cancéreux. L'IL-2 se fixe sur trois récepteurs qui sont composés des sous-unités α , β et γ , classés selon leur affinité. Le récepteur de faible affinité est en fait la chaîne α seule et ne transmet pas de signal. Les deux récepteurs clés sont le récepteur de moyenne affinité composé des fragments β et γ , et le récepteur de haute affinité composé des trois sous-unités (297). La problématique est que ce dernier est extrêmement présent sur les cellules T régulatrices et va donc stimuler une population qui serait néfaste pour le traitement du cancer par son action d'inhibition de la réponse immunitaire, tout en diminuant la biodisponibilité de l'IL-2 pour stimuler les autres cellules (298). L'effet de la dose est donc crucial pour obtenir un effet global favorisant les cellules T conventionnelles face aux cellules T régulatrices.

Encore une fois la demi-vie courte de cette cytokine est un problème pour son utilisation. L'addition de groupement PEG permet une meilleure demi-vie et a aussi un effet favorable sur l'affinité qui se biaise alors vers le récepteur de moyenne affinité (299).

De même que pour l'interféron l'IL-2 injecté par voie intraveineuse présente rapidement une toxicité en augmentant la dose (300). En utilisant encore une fois des modifications génétiques il est possible de contourner ce problème. Une version mutante fusionnée à des anticorps dirigés contre des molécules du microenvironnement tumoral est à l'essai pour adresser l'effet de l'IL-2 là où il est désiré, sans affecter les autres organes (301). Encore une fois, le traitement à l'IL-2 est envisagé plus comme un support à d'autres immunothérapies.

3.2.3. L'Interleukine-15 et les autres traitements

Hormis ces deux cytokines qui sont actuellement utilisées en clinique, plusieurs autres ont été et sont encore évaluées pour leurs bénéfices potentiels dans le traitement du cancer. L'autre cytokine majeure de la stimulation des NK et des CTL est l'IL-15 et, logiquement, de nombreuses études s'y sont intéressées. Comme vu plus haut, l'IL-15 nécessite d'être présentée avec la chaîne α du récepteur, *in vitro* des systèmes de stimulations des NK utilisent des cellules nourrices qui vont transprésenter l'IL-15. Il est donc nécessaire d'utiliser, non pas la cytokine seule, mais des complexes cytokines-récepteurs. Encore une fois de nombreuses stratégies ont permis de stabiliser

la molécule avec l'utilisation de protéines de fusion comme l'ATL-803 (302) utilisant des immunoglobulines ou la fusion avec l'apolipoprotéine (303). Des approches utilisant des cellules nourrices irradiées ou des fragments de ces cellules ont été envisagées (304). Dans la même famille que l'IL-2 et l'IL-15, l'IL-21 commence à être testée (305). Le facteur stimulateur de colonies granulocyte et macrophage (GM-CSF) est lui aussi testé pour stimuler les cellules dendritiques et les macrophages, mais il est apparu qu'il pouvait avoir un effet stimulant sur les cellules myéloïdes du microenvironnement tumoral qui pourraient favoriser le développement du cancer (306).

Globalement, seules, les cytokines ont un effet modéré sur le cancer. De plus, elles peuvent avoir des effets secondaires sévères. Administrées par voie veineuse, elles vont stimuler l'entière des cellules immunitaires du corps et peuvent déclencher des attaques auto-immunes dirigées contre des cellules saines. Il est donc essentiel de trouver des moyens ciblés pour les livrer à proximité des cellules cancéreuses, comme des voies d'injection alternatives ou des modifications qui favorisent une action plus longue et plus ciblée. Leur demi-vie faible et leur biodisponibilité les rendent difficiles à utiliser, mais en utilisant leur fonction comme support d'autres immunothérapies elles pourraient permettre une potentialisation. La synergie de ces approches est peut-être un outil essentiel pour obtenir un effet suffisant de l'immunothérapie pour arriver à une rémission.

3.3. Les bloqueurs de récepteurs inhibiteurs

Comme vu plus haut, l'expression de ligands des récepteurs inhibiteurs par les cellules cancéreuses peut être un frein majeur à l'action du système immunitaire pour s'en débarrasser. Si cette observation a prouvé une nouvelle stratégie d'évasion pour le cancer, elle a aussi permis de mettre en place des thérapies qui ciblent ce mécanisme. C'est ainsi que des anticorps bloquant l'interaction entre ces ligands et leurs récepteurs ont été testés pour réactiver le système immunitaire. On parle d'inhibiteurs de points de contrôle (« checkpoint inhibitors »).

Dans le contexte tumoral, l'inflammation chronique engendre une stimulation constante des cellules T et va donc forcer une réaction immunitaire prolongée. En s'activant continuellement, les

cellules T vont avoir un phénotype fonctionnel dit « épuisé ». Cet état est comparable à une infection virale chronique où la réaction immunitaire n'arrive pas à contrôler le virus. Un phénomène lié à cet épuisement va être l'expression en surface de multiples récepteurs inhibiteurs (307-309). Leur expression répond au besoin de terminer la réaction immunitaire face à une infection qui serait résolue. En ce sens, l'expression des récepteurs tels PD1 ou CTLA4 n'est pas forcément synonyme d'épuisement. Mais dans le cas d'une tumeur installée, l'accumulation de cellules qui expriment un grand nombre de récepteurs inhibiteurs témoigne de l'épuisement cellulaire global. Il est alors avantageux pour les cellules cancéreuses d'exprimer les ligands de ces récepteurs pour artificiellement terminer la réaction ou de favoriser leur expression dans le microenvironnement tumoral (310). En bloquant ce signal, l'activation des cellules T va reprendre car le signal du « point de contrôle » est levé. On observe alors un rebond de la réponse immunitaire face au cancer (311). C'est pour cela que l'on parle de bloqueur de point de contrôle.

3.3.1. L'anti-CTLA4

La première voie testée a été la voie CTLA4 (312). Le blocage de CTLA4 aurait pour effet de relancer l'expansion au site tumoral de lymphocytes T CD8⁺ et de certains sous-types CD4⁺ (313). Il joue donc un rôle dans l'initiation de la réponse T anti-tumorale. Une fois relancées, ces cellules vont donc se développer et monter une réponse forte contre le cancer. Étant donné qu'il s'agit de cellules infiltrant la tumeur et souvent spécifiques de certains néo-antigènes, l'effet bénéfique est très fort.

L'ipilimumab est le premier anticorps d'inhibition de point de contrôle à avoir été testé. Les résultats des premiers tests sur des patients atteints de mélanome étaient tellement encourageants qu'ils ont ouverts la voie à toute une série d'études utilisant les inhibiteurs de point de contrôle dans divers cancers. Aujourd'hui l'utilisation de ces molécules est approuvée dans de nombreux cancers et a changé drastiquement la façon de les traiter (314). Avec un recul de plusieurs années, il est maintenant possible de dire que les anti-CTLA4 ont permis de guérir à long terme environ 20% de patients atteints de mélanome résistant aux traitements conventionnels et de rallonger l'espérance de vie des autres de manière significative (315). Si à lui seul le traitement anti-CTLA4

ne permet pas de guérir tous les patients il a tout de même permis de démontrer l'efficacité des immunothérapies ciblées et l'importance du système immunitaire dans le traitement du cancer.

3.3.2. Les anti-PD1 et anti-PDL1

Parallèlement au traitement anti-CTLA4, l'inhibition du signal PD1 a été étudiée. Étant donné l'impact majeur qu'implique la voie PD1/ ligand de PD1 (PDL1) sur les lymphocytes qui pourrait détruire la tumeur il est logique de l'inhiber. Contrairement à CTLA4, la voie PD1 va avoir un impact plus tard dans la réaction des cellules T (316, 317). C'est en terminant la réponse et donc en préservant quelques clones T qui sont destinés à devenir des cellules mémoire que PD1 fonctionne normalement. Ici, la réponse initiale est donc déjà établie, mais la réactivation ne peut se faire car les clones T sont maintenus en anergie. En levant ce blocage la réaction peut redémarrer.

Plusieurs anticorps bloquants ont été développés soit pour bloquer le ligand PDL1, soit directement le récepteur. Les traitements ont démontré tout comme les anti-CTLA4 des effets bénéfiques dans de nombreux cancers (318, 319). Les divers anticorps ont été testés et intégrés aux protocoles de soins selon leurs meilleurs résultats en fonction des cancers.

D'autres voies d'inhibition sont explorées comme les récepteurs LAG3 ou TIM3 (320, 321). Bien que ce soient des cibles attractives, la compréhension des mécanismes qui régissent ces autres voies n'est pas complète. Il est possible que la réponse à des traitements utilisant ces cibles soit mauvaise, voire néfaste pour les patients. Il est donc important de continuer de comprendre ces mécanismes avant de les utiliser.

3.3.3. Les limites des inhibiteurs de point de contrôle

Malgré le succès majeur qu'ont apporté les anti-CTLA4 et anti-PD1, il reste de nombreux problèmes. Comme pour les cytokines, l'administration de ces molécules se fait par voie systémique et a un impact sur tout l'organisme. Il est connu que l'absence du signal PD1 chez la

souris KO entraîne de nombreux problèmes d'auto-immunité. Il était donc attendu de retrouver des effets similaires chez les patients suivant un traitement d'inhibiteurs de point de contrôle (322).

Un désavantage majeur est aussi que les cancers n'utilisent pas systématiquement ces voies d'inhibition pour échapper au système immunitaire. Dans le cas où les clones cancéreux n'expriment pas de ligands des points de contrôles, le gain thérapeutique de ces traitements pourrait être minime, voire inexistant (323). Il est à noter que le blocage général des voies inhibitrices peut entraîner une activation plus forte bénéfique pour l'action anti-tumorale même en l'absence de l'expression des ligands sur les cellules cancéreuses, notamment par l'inhibition des voies PD1 engagées par le microenvironnement (324).

Ces traitements sont majoritairement basés sur la réponse T et donc liés à une réponse à un antigène. Il a été montré que le taux de mutation et la présence de néo-antigènes était directement relié à la réponse aux traitements par les anticorps anti-PD1 et anti-CTLA4 (325). En effet, bien que l'on puisse relancer la réponse T, si il n'y a pas de clones T pouvant reconnaître la tumeur le traitement aura peu de chance de fonctionner. Cela explique pourquoi certains cancers répondent mieux que d'autres (326). En effet, selon les cancers, le taux de mutations et donc le nombre potentiel de néo-antigènes varie.

Un autre problème vient aussi du fait que malgré le rebond d'activation, le cancer peut échapper au contrôle encore une fois en déployant d'autres mécanismes d'évasion. Dans ce cas, le surplus d'activité va terminer d'épuiser les clones T réactifs et rendre d'autant plus inefficace les traitements par bloqueurs de point de contrôle (327, 328).

Si les inhibiteurs de points de contrôles ne sont pas parfaits et qu'ils ne permettent pas la guérison de tous les patients, ils restent des découvertes majeures. L'avancée que représentent les traitements par anticorps bloquants anti-CTLA4 et anti-PD1 et l'impact sur les soins du cancer ont valu à leur inventeurs James Allison et Tasuku Honjo le prix Nobel en 2018. Preuve de l'importance des découvertes de nouveaux traitements du cancer.

Les points évoqués jusqu'ici, bien qu'ils nécessitent une action extérieure, se basent sur une activité physiologique, l'activation est améliorée soit par réaction allogénique dans la greffe de moelle, soit par stimulation secondaire en utilisant des cytokines, soit par la levée de voies d'inhibition. En se limitant à une reconnaissance classique ces thérapies ont déjà prouvé l'efficacité de

l'immunothérapie. Mais en utilisant des moyens externes pour, cette fois ci, rediriger l'activation via de nouveaux signaux il est possible de dépasser encore ces bénéfices thérapeutiques du système immunitaire

3.4. Les anticorps monoclonaux ciblant le cancer

Un des points évoqués dans l'évasion tumorale est la perte d'une synapse immunologique activatrice tant par le manque de molécules pouvant fixer les cellules que par les signaux activateurs trop faibles par rapport à l'inhibition renvoyée par le cancer. Un moyen facile de rétablir une action immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuse est l'utilisation d'anticorps qui vont se fixer à leur surface.

3.4.1. L'anti-CD20, Rituximab

Pour cibler les leucémie et lymphomes provenant de cellules B, un anticorps dirigé contre le CD20 a été développé, le Rituximab. L'utilisation de cet anticorps a permis d'améliorer grandement la réponse immunitaire et les traitements de ces cancers (329, 330). C'est aussi le premier anticorps monoclonal utilisé en oncologie et, à ce titre, il a ouvert la voie à cette classe de médicament.

L'étude de l'effet du Rituximab a permis de comprendre les divers moyens d'action contre le cancer que pouvait avoir un anticorps. Le premier étant la lyse par les molécules du complément. C'est en cristallisant la portion Fc de l'anticorps et en regroupant les molécules de CD20 dans les radeaux lipidiques que la cascade de réaction du complément est initiée et les cellules lysées (331, 332). En parallèle, le second mécanisme utilise la détection des cellules marquées par les anticorps par le CD16 des cellules NK engendrant ainsi une lyse par ADCC (333). Ce même récepteur peut déclencher le troisième mécanisme par activation des macrophages, ainsi que par l'intermédiaire des récepteurs du complément. Les macrophages vont intégrer ce signal et attaquer les cellules cancéreuses ciblées. Le dernier mécanisme est une lyse directe qui semble être médiée par un signal

interne de recrutement de kinases Src qui vont déclencher l'apoptose suite à l'accumulation de CD20 dans les mêmes zones de la membrane (334, 335).

Ces actions multiples donnent au rituximab un effet bénéfique très important et, en tant que molécule ciblée, sa toxicité est dirigée exclusivement contre les cellules ciblées, c'est-à-dire celle exprimant le CD20. Il y a donc bien moins d'effets secondaires à attendre que la chimiothérapie, mais pour autant cette thérapie n'est pas exempte de défaut. De manière intrinsèque, le rituximab cible également l'ensemble des cellules B saines qui expriment le CD20 déclenchant ainsi une profonde lymphodéplétion B (336). Si en soit cet effet est attendu et peut être géré dans le cadre de la thérapie, il implique des altérations du système sanguin et lymphatique liés à la disparition des cellules B. D'autres problèmes ont été reportés, notamment des infections, ce qui semble logique au vu de la perte de la fonction B, mais aussi des atteintes rénales, cardiaques ou respiratoires (337).

On observe toujours pour plus de la moitié des patients des rechutes même avec le traitement anti-CD20. Il est possible pour les clones cancéreux de perdre l'expression du CD20 (338), mais aussi de mettre en place d'autres mécanismes qui vont tout de même inhiber la réaction immunitaire. D'autres anticorps, comme le trastuzumab dirigé contre l'antigène HER2 dans le cancer du sein, sont basés sur la même approche et ont montré une certaine efficacité, mais il est encore une fois nécessaire que le cancer exprime l'antigène ciblé, ce qui n'est pas systématique. Bien que ces effets n'invalident pas l'aspect bénéfique des anticorps en oncologie, ils montrent que ce n'est pas encore le traitement idéal.

3.4.2. Les BiKE et TriKE (Bispecific et Trispecific Killer cell Engager)

Une autre approche d'immunothérapie vise à restaurer un contact activateur au niveau de la synapse, mais cette fois-ci en liant deux molécules via un pont d'anticorps. L'utilisation d'anticorps recombinants qui lient des molécules de surface à des récepteurs de cellules NK ont été développés, ce sont les BiKE et TriKE (340, 341). L'idée ici est double, le traitement va permettre de restaurer l'interaction à la synapse immunologique et de lier des molécules présentes sur les cellules cancéreuses à des récepteurs activateurs des cellules NK, permettant ainsi une activation supplémentaire (Figure 6).

La première génération de ces molécules, les BiKE, fusionnait deux fragments d'anticorps liés entre eux par un segment de liaison. Les anticorps sélectionnés reconnaissaient le CD33, molécule cible des leucémies aigües myéloïdes, d'une part et le CD16 d'autre part. Comme vu plus haut le CD16 est un signal fort d'activation des NK qui déclenche en temps normal l'ADCC. Comme vu précédemment, le CD16 peut à lui seul stabiliser la synapse NK et donc rétablir une synapse active pour déclencher une lyse cellulaire. Bien que cette approche soit intéressante, elle n'a donné que des résultats peu convaincants (340, 341).

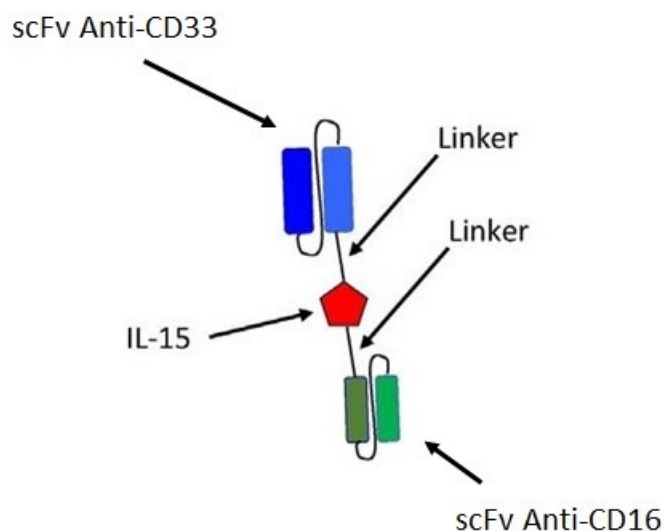


Figure 6. – Schéma d'un TriKE

(adapté de Zachary B. Davis, Daniel A. Vallera, Jeffrey S. Miller, Martin Felices, Natural killer cells unleashed: Checkpoint receptor blockade and BiKE/TriKE utilization in NK-mediated anti-tumor immunotherapy, *Seminars in Immunology*, Volume 31, ©2017, Pages 64-75, avec la permission d'Elsevier)

L'idée de donner alors un second signal pour amplifier la population d'intérêt a alors émergée. En ajoutant l'IL-15 à la protéine de fusion la fixation à la synapse engendre un signal de prolifération des NK et va en plus limiter l'action de l'IL-15 en l'adressant au site tumoral (Figure 6). Il est d'ailleurs montré dans des modèles pré-cliniques que la stimulation avec les TriKE permet un traitement avec des doses élevées sans observer les mêmes effets négatifs qu'avec l'IL-15 (341). Cette thérapie a été pensée comme un adjuvant à l'injection de cellules NK par transfert adoptif,

elle est donc directement pensée pour être utilisée en combinaison. Mais il semblerait que son effet seul sur le système immunitaire soit suffisamment fort pour être testé sans autre traitement.

Ces traitements sont encore trop récents pour savoir quels seront leur impact sur les soins en oncologie et ils peuvent nécessiter un raffinement pour pouvoir être utilisés.

Bien que toutes les méthodes jusqu'ici présentées permettent de surpasser certains mécanismes d'évasion, elles sont toujours basées sur les capacités biologiques d'activation du système immunitaire. Sans signaux activateurs, même en levant l'inhibition, il est impossible d'avoir une réponse immune assez forte. Une autre approche vise à augmenter les possibilités naturelles des cellules immunitaires en ajoutant par génie génétique un nouveau récepteur qui va permettre de reconnaître le cancer. C'est cette approche qui a donné naissance aux récepteurs chimériques d'antigène (CAR).

3.5. Les Récepteurs Chimériques d'Antigènes

3.5.1. La structure des CAR

Les CAR sont des récepteurs artificiels créés par génie génétique. Ils sont construits par assemblage de quatre portions qui peuvent chacune être modulée au besoin. La portion extracellulaire est composée d'une chaîne simple de fragment variable (scFv) qui est une fusion entre les chaînes variables lourde (Vh) et légère (Vl) d'un clone d'anticorps. Cette construction élimine les chaînes communes pour ne garder que la portion spécifique de l'anticorps. Pour lier les deux chaînes un « linker » faisant entre 10 et 25 acides aminés est utilisé pour permettre un positionnement correct des deux chaînes entre elles (Figure 7) (342). Il est à noter que l'ordre d'encodage des chaînes d'un scFv peut varier et il est difficile de prévoir quelle construction sera la plus efficace pour maintenir l'affinité de l'anticorps (343). Pour adresser correctement le CAR à la surface, c'est le scFv qui va aussi jouer le rôle de peptide signal, puisque sa structure implique que le réticulum endoplasmique l'envoie dans ce compartiment (344).

Pour obtenir une flexibilité moléculaire suffisante le fragment scFv est lié à des domaines immunoglobulines qui vont allonger cette portion extracellulaire. On parle de charnière ou « hinge » (Figure 7). Cette portion est basée soit sur des domaines des IgG soit sur des fragments des molécules CD4 ou CD8 α (345). Pour ancrer le récepteur dans la membrane cytoplasmique, le CAR possède ensuite un domaine transmembranaire lipophile, souvent issu du CD8. Il s'agit d'une hélice α qui lie les portions externe et interne du CAR.

La portion intracellulaire du CAR est composée d'un ou plusieurs segments de signalisation qui vont avoir pour rôle de d'activer les cellules en réponse à l'antigène détecté en surface (Figure 7). Ces segments peuvent varier et la force du signal qui en découle est alors modifiée. Il a été noté qu'en liant un signal primaire via la chaîne ζ du CD3 avec un signal de costimulation CD28 ou 4-1BB les cellules répondaient très efficacement sans autre signal (346-348). Il est possible de moduler ces signaux à façon selon l'effet recherché.

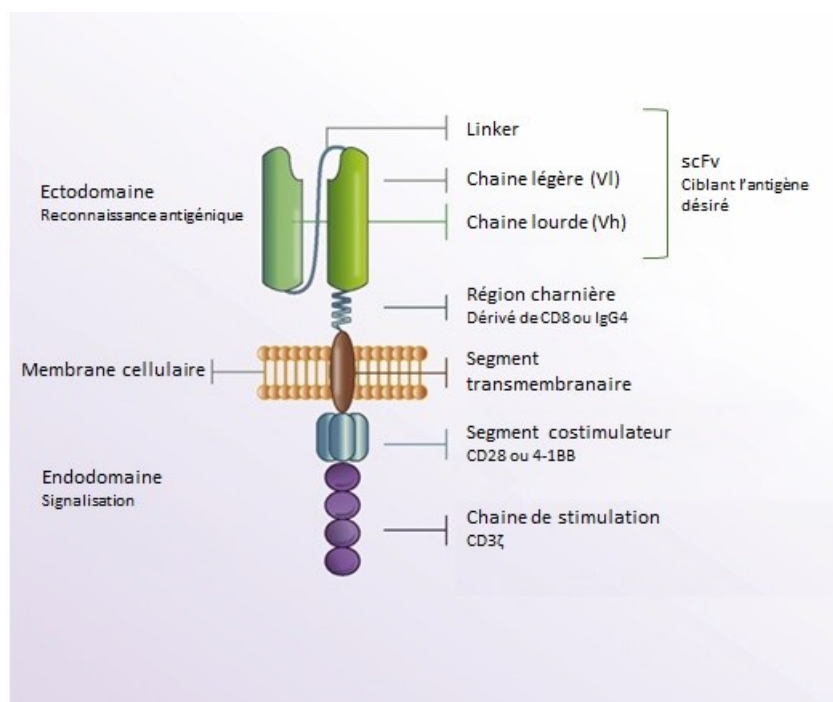


Figure 7. – Schéma de la structure d'un CAR

(traduit de Gill S, Maus MV, Porter DL. Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25years in the making. Blood Rev. ©2016;30(3):157–167, avec la permission d'Elsevier)

3.5.2. Le scFv et la problématique de la cible

3.5.2.1. Toxicité selon la cible

Avec la possibilité d'utiliser n'importe quel anticorps pour générer un segment scFv pour la portion extracellulaire du CAR, vient l'idée de cible de la thérapie CAR. Les thérapies actuelles se basent sur la reconnaissance classique des cellules immunitaires mais en utilisant un nouveau récepteur il devient possible de biaiser cette reconnaissance. En faisant ce biais, un des problèmes évident est le risque de cibler des cellules saines et donc de mettre en danger la fonction des organes. Il est ainsi apparu le concept de toxicité « *on-target off-tumor* », qui exprime le fait d'avoir en dehors de l'effet anti-tumoral recherché une toxicité induite par les cellules infusées sur des cellules saines initialement non ciblées. Au sein même de ce concept, la problématique est différente en fonction des potentielles cellules saines ciblées. Dans le cas de la leucémie, même si l'ensemble des cellules B sont affectées il n'y a pas de problème vital direct (349), en revanche en ciblant des antigènes myéloïdes dans le cadre de l'AML, l'infusion de CAR entraîne une aplasie médullaire fatale (350).

Cible	Cancer visé	Etat
BCMA	Myelome multiple	Essai clinique (Phase 1-2)
CD19	Leucémie ou lymphome B	Commercial
CD20	Leucémie ou lymphome B	Essai clinique (Phase 1)
CD22	Leucémie ou lymphome B	Essai clinique (Phase 1)
CD33	AML	Essai clinique (Phase 1)
CD123	AML	Essai clinique (Phase 1)
EGFRvIII	glioblastome	Essai clinique (Phase 1)
GD2	Neuroblastome, mélanome	Essai clinique (Phase 1)
Her2	Glioblastome, cancer ovarien, osteosarcome, adenocarcinome pancréatique	Essai clinique (Phase 1)
Mesothelin	Cancer pancréatique	Essai clinique (Phase 1)
MUC1,Tn-MUC1	Glioblastome, carcinome, cancer des poumons	Essai clinique (Phase 1)
PSMA	Cancer de la prostate	Essai clinique (Phase 1)

Tableau 1. – Liste de cible de CAR actuellement utilisées

Plusieurs points sont critiques dans la thérapie CAR. La cible définie est bien entendu le premier critère qui va non seulement déterminer la spécificité et donc le cancer ciblé, mais aussi les potentiels effets « *on-target, off-tumor* » c'est-à-dire sur des cellules que l'on ne veut pas toucher avec la thérapie mais qui sont tout de même ciblées par le CAR (Tableau 1). La première cible utilisée par les CAR est le CD19 dans le cadre de la leucémie B (351). L'avantage de cette cible est que l'effet *off tumor* est centré sur la population B dans son ensemble, ce qui ne représente pas une menace pour la vie du patient. En effet, malgré une aplasie B, l'injection d'immunoglobulines permet de d'éviter des infections graves liés à l'agammaglobulinémie secondaire à la déplétion B (352). En somme, l'effet *off tumor* est volontairement maintenu pour ne pas compromettre l'efficacité du traitement. Dans le cas des tumeurs solides, l'antigène disialoganglioside (GD2) a par exemple été déterminé comme une cible intéressante pour les neuroblastomes. Néanmoins, l'expression de cet antigène peut être retrouvée sur des cellules nerveuses saines et donc engendrer une réaction inflammatoire forte dirigée contre ces cellules (353). Il pourrait alors y avoir de graves séquelles neurologiques et une douleur intense liée directement au traitement. Il a d'ailleurs été observé que les effets indésirables corrélaient avec une bonne réponse au traitement (354, 355). Dans le cas du GD2 il est indispensable de limiter les effets *off-tumor*, contrairement au CD19. Dans certains cas une cible peut être complètement inutilisable à cause de cet effet. Dans le cadre de la leucémie myéloïde aigüe (AML) l'antigène CD33 a été proposé comme cible potentielle (356). Malheureusement, l'expression de CD33 sur l'ensemble de la population myéloïde ainsi que sur des progéniteurs précoces de l'hématopoïèse dirige la cytotoxicité vers ces cellules de la moelle osseuse (357, 358). Cette réaction immunitaire entraîne alors une aplasie médullaire intense qui est mortelle (350, 359). Ainsi l'antigène CD33, bien que largement exprimé par les AML, est inutilisable à cause de sa toxicité sur les cellules saines. On voit ici trois exemples de cibles avec chacune un degré d'acceptabilité différent d'effet *off-tumor*.

Un aspect important de la thérapie CAR est donc de cibler le bon antigène. De nombreuses recherches sont centrées sur cet aspect, notamment en utilisant les outils de séquençage de nouvelle génération (360-362). En séquençant le génome des tumeurs isolées de patient, il devient possible de trouver l'expression de molécules propres à la tumeur ou surexprimées en regard au tissu sain.

3.5.2.2. Types d'antigènes cibles

On peut discriminer plusieurs types de cibles. Le plus évident est un antigène exprimé uniquement sur la tumeur. Il peut s'agir d'une protéine mutée qui apparaît suite à une mutation de sa séquence dans le cancer, on parle alors de néo-antigène. Étant bien entendu la cible parfaite, puisque présents sur les cellules cancéreuses uniquement, ces néo-antigènes sont très étudiés (363). Ils peuvent provenir de plusieurs types de mutations et donc avoir des degrés d'immunogénicité divers.

Il peut survenir une mutation ponctuelle d'un nucléotide entraînant un changement d'acide aminé. Ces mutations ponctuelles non-synonymes peuvent générer un nouvel antigène en perturbant largement la structure de la protéine (364). Étant donné qu'il n'y a alors le changement que d'un seul acide aminé, le changement peut être trop mineur sur la structure pour affecter sa détection spécifique (365). Il est également possible que la portion mutée affecte une portion intracellulaire et donc indétectable par un CAR. La mutation peut aussi affecter une portion de protéine utilisée par la cellule pour l'adressage et permettre une expression membranaire à des protéines normalement réservées à des compartiments internes comme les lysosomes (366, 367). Dans ce cas, il est possible de voir apparaître des antigènes de surface spécifiques au cancer permettant un ciblage parfait. Il est également possible que des mutations non synonymes modifient un site de glycosylation ou de maturation pouvant ainsi générer un épitope inexistant sur les cellules saines et donc un néo-antigène (368, 369).

Des mutations de délétion ou d'insertion de base peuvent également survenir dans un gène et créer un décalage du cadre de lecture. Dans ce cas, il est hautement probable de voir apparaître un codon stop précoce. Cette disruption de la protéine peut empêcher son expression soit par une déstabilisation des acides ribonucléiques (ARN), soit par une protéine qui ne peut être adressée correctement, soit une instabilité intrinsèque à la protéine elle-même. Dans ce cas, la perte d'expression peut être un outil de discrimination entre cellules saines et cancéreuses. Cependant une stratégie utilisant des anticorps ou un CAR conventionnel ne peut fonctionner car la cible ne peut servir pour une activation du système immunitaire. Il est cependant possible d'utiliser des stratégies combinatoires. Il est possible de changer les segments intracellulaires pour des portions de récepteurs inhibiteurs comme PD1 pour inhiber la signalisation d'un autre CAR (370). En utilisant

ainsi un système de double CAR il est possible d'obtenir un effet fort et maintenu contre la tumeur tout en inhibant la réponse dirigée contre le tissu sain qui aura gardé l'expression de la protéine.

Lors de la transformation tumorale, l'occurrence de fusion de gène est souvent un élément déclencheur comme vu plus haut. Les fusions de gènes peuvent alors donner des protéines aberrantes qui peuvent devenir des antigènes cibles très spécifiques. Pour en faire des cibles thérapeutiques il faut en revanche que ces molécules apparaissent en surface. Étant donné que ce type de fusion est souvent générateur de tumeur lorsqu'il concerne des facteurs de transcription la protéine est rarement adressée à la surface (371). Cependant il est possible que la cellule dégrade cette nouvelle molécule et la présente via les molécules du MHC et soit donc utilisable comme cible notamment via la reconnaissance des cellules T (372, 373).

Il est également possible d'avoir une mutation dans des régions non-codantes qui peuvent réactiver ou augmenter l'expression d'un gène. Les cellules cancéreuses peuvent alors avoir un profil d'expression différent bien que la molécule ciblée soit identique. Ce genre de mutation peut apparaître soit dans la région promotrice d'un gène soit dans une région régulatrice qui peut être distale ou intronique (374).

Toute cette problématique de cible des CAR est cruciale si on veut adapter cette approche à de nouveaux cancers.

3.5.3. La charnière et le segment transmembranaire

Le segment charnière est essentiel pour permettre une interaction correcte du CAR avec sa cible. Peu d'études ont été faites sur ce segment mais il est clair que la dynamique de fixation du CAR est largement influencée par cette portion (375). Il semble que selon la molécule ciblée il soit important d'ajuster la longueur de ce segment de liaison. Plus la molécule cible est proche de la membrane ou ancrée dans des réseaux de sucres, plus il sera avantageux d'avoir une charnière longue pour permettre au CAR de se lier à sa cible dans la synapse immunologique. A l'inverse, si l'épitope ciblé est à l'extrémité d'une longue chaîne protéique il sera plus avantageux d'avoir une charnière qui permet simplement une certaine flexibilité proche de la membrane de la cellule T pour fixer l'antigène (376).

On voit donc que cette portion, tout comme le fragment scFv, doit être adaptée pour chaque CAR et convenir à sa dynamique moléculaire. Il est même possible d’imaginer que la charnière du CAR ait un rôle dans la dimérisation et le signal envoyé par le CAR. De plus, ce fragment est logiquement la zone la plus simple à détecter par marquage immunofluorescent, un point important pour stabiliser la qualité des produits de thérapie cellulaire en contrôlant la proportion de cellule exprimant le CAR et l’intensité d’expression (377).

Le segment transmembranaire aussi est peu étudié. Il semblait initialement utile uniquement pour donner une structure transmembranaire au CAR, mais il semble qu’il soit très important pour la dynamique de dimérisation et donc la signalisation. En faisant simplement varier cette portion il peut y avoir une variation dans l’activation liée probablement à la proximité qu’il permet avec les autres récepteurs et kinases associées (377). En favorisant ou en diminuant la proximité avec les molécules accessoires ancrées dans la membrane, cette portion du CAR pourrait jouer un rôle crucial. Il est possible également, tout comme le TCR, que la flexibilité permise par le domaine transmembranaire joue un rôle sur le repliement des signaux internes et les forcent à avoir une conformation accessible pour la phosphorylation et la signalisation. De même que la charnière, il est possible que ce domaine doive être adapté en fonction des domaines intracytoplasmiques qui le succèdent.

Comme l’expression membranaire du CAR est très forte, sa densité dans la membrane va largement influencer la dynamique des lipides membranaires. La localisation exacte par rapport aux radeaux lipidiques et sa co-localisation en micro-agrégats pourraient jouer un rôle sur la formation de la synapse.

3.5.4. Les segments internes et la signalisation

Initialement vu comme un moyen d’établir une nouvelle spécificité des cellules T qui ne serait plus restreinte par la reconnaissance via le TCR, les premiers CAR utilisaient comme segment interne la portion ζ du CD3. Ce domaine protéique comporte 3 ITAM et permet, dans le cas du TCR, de démarrer toute la réponse T à lui seul. Ces CAR de première génération avaient bien un effet

antitumoral, prouvant que la spécificité des cellules T avait bien été redirigée et qu'il était possible d'utiliser les CAR pour cibler les tumeurs avec un transfert adoptif de cellules T. Cependant les signaux envoyés par ces CAR de première génération ne suffisaient pas à induire une réponse complète (378). Contrairement au TCR ou de nombreuses chaînes s'assemblent pour former un complexe possédant de très nombreux ITAM et recrutant des protéines accessoires et des kinases, dans ces premiers essais seul le CD3 ζ était engagé. Comme vu plus haut, il est nécessaire pour obtenir une réponse T complète d'avoir des signaux secondaires pour déclencher l'activation complète et démarrer la prolifération des clones T (379, 380). Après ce constat, l'idée d'intégrer d'autres chaînes de signalisation pour renforcer l'activation fut avancée.

La logique étant de donner un signal secondaire de costimulation la chaîne de signalisation intracellulaire du CD28 a été introduite dans la construction du CAR (381). CD28 étant l'archétype du signal costimulateur il était logique de l'intégrer, mais en parallèle un autre signal très important a aussi été testé, le 4-1BB (382, 383). Ce récepteur active de nombreuses voies de signalisations notamment de sécrétion de cytokines et de prolifération. Testés parallèlement, ces deux CAR de deuxième génération ont donné des résultats très positifs et sont actuellement la base de toutes les thérapies CAR. L'activation engendrée par la liaison de ces récepteurs à leur antigène génère une forte réponse T, une toxicité immédiate, une grande production de cytokines et une prolifération des cellules thérapeutiques et des autres cellules immunitaires qui participent à leur action.

De manière intéressante, la stimulation par le CAR intégrant le signal CD28 semble plus intense, elle est notamment corrélée à une production de cytokines plus grande et une activation périphérique très intense (384). A tel point que l'utilisation de cellules T modifiées avec ce CAR est souvent liée à des effets secondaires trop forts qui obligent à inhiber la réponse T et donc à interférer avec le traitement. A l'inverse, si ces effets ne sont pas absents lors du traitement avec des T transduits avec la construction CAR intégrant le 4-1BB, ils semblent moindres et ce traitement semble avoir un effet plus étalé dans le temps (382, 384).

Le développement d'autres CAR dits de troisième génération a été poursuivi en tentant d'intégrer les deux signaux costimulateurs dans le même CAR ou d'autres segments ayant un potentiel de costimulation. Contrairement aux attentes, ces molécules n'ont pas permis d'observer une réponse plus efficace (385, 386). Il semble que la complexification de la structure du CAR empêche les signaux des différents segments d'avoir un effet synergique. Il est aussi possible que la longueur

de la chaîne protéique la rendent inaccessible aux kinases censées phosphoryler ces domaines soit en les plaçant trop loin de la membrane soit en leur donnant une conformation qui ne permet plus leur accès.

3.5.5. Le succès clinique des CAR

Les premiers tests cliniques des CARs de seconde génération ont démontré une réponse rapide et très forte contre l'ALL. Les patients enrôlés étant atteints de leucémie résistante réfractaire étaient donc dans une impasse thérapeutique. Malgré l'état très avancé de la leucémie l'ensemble des patients ont répondu positivement au traitement. Une disparition des blastes leucémiques en circulation dans tous les patients a été observée. Cette réponse ne s'est pas maintenue pour tous les patients mais le traitement a permis d'achever une rémission complète et maintenue dans plus de la moitié des patients traités alors qu'ils ne répondaient à aucun autre traitement (387). Cette première preuve de l'efficacité des traitements par CAR a permis de développer cette approche jusqu'à aujourd'hui la faire accepter par les organismes de santé à travers le monde. Les traitements commerciaux actuels ciblant le CD19 reproduisent ces observations on retrouve une réponse initiale très favorable permettant une rémission dans 70 à 80% des cas. Le suivi n'ayant pas encore été aussi loin que dans les premiers essais cliniques, il est encore difficile de savoir quelle proportion de patient finira par rechuter (388).

3.5.6. Les problèmes des CAR

3.5.6.1. La toxicité de la thérapie CAR

Ces premières études ont rapidement mis en lumière les divers effets toxiques des CAR. L'effet toxique attendu étant bien entendu la disparition des cellules B de la circulation sanguine. Cet effet a bel et bien été observé et a dû être géré par injection d'immunoglobulines et un suivi médical pour les infections potentielles liées à l'absence de fonction B.

Un effet secondaire majeur retrouvé chez la quasi-totalité des patients est le syndrome de relargage cytokinique (389, 390). L'infusion d'un grand nombre de cellules T exprimant le CAR a pour effet une activation massive en réponse aux blastes leucémique et aux cellules B qui résulte en une sécrétion supra-physiologique de cytokines pro-inflammatoires. Cette sécrétion installe une inflammation systémique très intense donnant de nombreux effets indésirables qui peuvent être tolérable dans certains cas mais peuvent menacer la vie du patient dans les cas plus extrêmes. Les symptômes sont généralement une forte fièvre et des douleurs musculaires, mais si le syndrome est trop fort on retrouve des problèmes vasculaires, des insuffisances respiratoires et des troubles neurologiques (391, 392). Le traitement par cellules CAR T peut donc en lui-même causer la mort du patient juste via cette énorme réponse inflammatoire. Les sécrétions d'IL-6 sont centrales dans ce mécanisme et le phénomène peut être endigué par l'injection d'anticorps bloquants cette cytokine (393, 394). Il semble que la quantité de cellules tumorales au moment de l'injection corrèle avec l'intensité du syndrome de relargage cytokinique (387). Bien que ce syndrome soit dangereux pour la vie des patients il semble aussi corrélér à l'expansion périphérique et donc à une réponse positive au traitement (395).

3.5.6.2. La perte de l'antigène cible

Avec maintenant plusieurs années de recul sur les premiers tests des CAR T il est possible d'étudier les causes de rechute. L'une d'elle est la perte de l'antigène cible. En effet, il est apparu que 10 à 20% des patients avaient toujours en circulation des cellules thérapeutiques mais un clone tumoral ayant perdu l'expression de l'antigène CD19 ciblé s'est développé en parallèle (387, 392, 396). Ce phénomène montre que le concept d'édition immunitaire de la tumeur peut aussi s'appliquer à une action immunitaire non physiologique comme les CAR.

Pour contrer ce phénomène, il serait préférable d'utiliser comme cible une molécule qui a peu de chance d'être réprimée comme une molécule importante pour la stimulation de la croissance tel un récepteur de facteur de croissance, à ce titre l'EGFRvIII a été ciblé dans le glioblastome (397). Il s'agit d'une version mutée du récepteur à l'EGF issu d'un épissage aberrant qui permet une activation constitutive du signal (398). Cette cible est en plus exclusive au cancer.

Il est aussi possible d'utiliser des signaux qui forcent la réexpression de l'antigène cible. Récemment une forme anormalement glycosylée de la mucine 1 (MUC1) a été déterminée comme une cible très intéressante car exprimée dans de nombreux cancers solides (399). Le traitement à l'IL-22 semble augmenter son expression en surface des cellules cancéreuses en même temps qu'il stimule les lymphocytes T permettant un double effet qui permettrait d'éviter l'évasion par perte de l'antigène (400).

Une autre approche serait d'utiliser deux cibles en parallèle à l'aide soit d'un CAR intégrant deux fragments scFv et pouvant lier l'un ou l'autre des antigènes soit d'utiliser deux CAR distincts issus de la même cassette intégrée aux cellules T (401, 402). Cette stratégie s'apparente aux traitements antibiotiques et à la pression de sélection qu'ils imposent sur les bactéries. En appliquant simultanément deux nouvelles pressions de sélection la probabilité de voir un mécanisme de résistance apparaître pour chacune des pressions sur la même cellule devient beaucoup plus faible. En jouant ici sur l'immunoédition de manière plus rapide, il devient difficile pour le cancer de s'adapter.

3.5.6.3. La difficulté de production des cellules thérapeutiques

Une fois les CAR plus largement diffusés et les essais cliniques plus nombreux il est apparu une autre problématique liée à la production des cellules CAR T. En effet les patients traités ont souvent subi plusieurs cycles de chimiothérapie et parfois ont déjà reçu une greffe de moelle osseuse, compromettant largement le compartiment T. Il peut donc parfois être difficile de récupérer une grande quantité de cellules T et les traitements subis peuvent également altérer aussi leur phénotype. Pour amplifier ces cellules il peut donc être nécessaire de les cultiver longtemps *ex vivo*, augmentant donc les coûts liés à la culture cellulaire (403).

Dans certains cas, il faut donc partir d'un petit nombre de cellules T, il faut les transduire par vecteur rétroviral et les amplifier suffisamment pour obtenir une réponse systémique suffisante pour éliminer toute trace de la leucémie. La transduction peut être en soit une difficulté. Les cellules T activées sont facilement transduites par des vecteurs rétroviraux classiques, cependant les cellules NK sont nettement plus difficiles à transduire (404). Expliquant en partie pourquoi les

cellules NK n'ont pas été utilisées aussi facilement que les T. Si la transduction en elle-même peut s'avérer problématique, il est aussi important de mentionner les coûts de production et l'importance du contrôle de la qualité des vecteurs viraux produits ainsi que du produit cellulaire final.

Ces divers aspects montrent que les protocoles pour générer le produit thérapeutique final ne sont pas toujours suffisamment efficaces pour standardiser la production de cellules CAR T. Les protocoles d'amplification et de transduction visent à s'améliorer pour éviter que les patients traités ne soient pas toujours injectés avec le même nombre de cellules thérapeutiques.

Cette problématique est aussi un point important pour l'utilisation des cellules NK dans la thérapie CAR. Si l'efficacité des CAR-NK a été prouvée dans des études précliniques, leur utilisation clinique est limitée par plusieurs barrières techniques. L'amplification des cellules NK est actuellement bien maîtrisée notamment par le système d'activation et d'expansion des cellules NK (NKAES) (296), cependant si cette méthode permet la production en grand nombre de cellules NK elle ne favorise pas la cryopréservation des cellules NK. La survie des cellules T face à la congélation est un paramètre les favorisant face aux cellules NK (405). Cet aspect est important pour faciliter l'utilisation des cellules NK en clinique.

Un autre aspect est le niveau de transduction par les vecteurs viraux, qui sont très efficaces sur les cellules T mais bien moins sur les cellules NK (406). Cet aspect pourrait être dû à une expression plus faible des récepteurs d'entrée des virus utilisés (407) ou à des mécanismes internes comme la séquestration des acides nucléiques à l'œuvre dans les monocytes (408). Ce problème technique rejoint les autres défis de production à grande échelle de cellules thérapeutiques et représente une étape essentielle à franchir pour développer l'utilisation des CAR.

3.5.6.4.Épuisement et disparition des cellules thérapeutiques : l'importance du signal tonique

La production de CAR T impose donc plusieurs cycles d'expansion cellulaire qui vont parfois épuiser les cellules. L'activation qui est utilisée pour les faire proliférer leur donne aussi un phénotype d'effecteur terminaux qui va donc laisser peu de cellules capables de reprendre des cycles de prolifération. La prolifération intense va impliquer une diminution des télomères et les

nombreux cycles de réplication ADN peuvent mener à l'accumulation de mutations qui mèneront les cellules en apoptose. Mis ensemble, ces points corréleront avec les observations cliniques où les cellules infusées disparaissent rapidement. Ces effecteurs terminaux vont avoir une action cytotoxique mais peu d'entre eux vont avoir un effet mémoire qui va leur permettre d'établir des clones résidants qui pourront persister et maintenir à long terme la surveillance immune du CAR.

L'établissement de clones T mémoire et la persistance des cellules thérapeutiques ont été observés uniquement en utilisant la construction de seconde génération intégrant le signal 4-1BB (409). Il semble que la capacité de ce signal à préserver les cellules de l'épuisement cellulaire et le fait qu'il favorise la prolifération améliore son potentiel à générer des T mémoire (410). À l'inverse le signal CD28 semble potentialiser la réponse immédiate qui semble être plus intense car favorisant de plus fort relargages cytokiniques.

Les études sur les signaux CAR ont ensuite mis en évidence un mécanisme crucial dans l'activité des CAR qui est responsable de l'épuisement et de la disparition en périphérie des cellules T : le signal tonique. Il s'agit d'un signal indépendant de la fixation du ligand du récepteur qui apparaît quand deux molécules se dimérisent juste par leur proximité. Le signal tonique du TCR a été décrit et montré comme bénéfique dans le cadre physiologique. Il permet de maintenir un certain niveau basal de signaux activateurs et favorise une réponse rapide des cellules T, mais cette dimérisation spontanée est en réalité liée à son interaction avec des molécules de MHC. Dans le cadre du CAR le signal tonique est totalement indépendant et lié uniquement à la très forte densité d'expression en surface.

Les effets du signal tonique ne sont pas systématiquement délétères. Il a notamment été montré *in vitro* un avantage prolifératif des cellules T transduites par rapport à des cellules T normales car les signaux de costimulation envoyés par le signal tonique favorisent la prolifération et la formation de cellules ayant un phénotype mémoire. Cependant, les effets négatifs observés *in vivo* semblent compromettre des points clés de la réussite du traitement, à savoir l'épuisement cellulaire et la disparition des cellules thérapeutiques.

Les mécanismes affectant le signal tonique sont nombreux. Il a été montré que l'intensité de ce signal basal est largement affectée par le fragment scFv. En comparant les CAR ciblant le GD2 et le CD19 il a été mis en évidence que le signal tonique était différent alors qu'il n'y avait pas d'antigène cible. Il semble que ce soit les segments Vh et Vl des scFv qui interagissent entre deux,

trois ou quatre molécules CAR différentes car le segment de liaison permet une trop grande flexibilité (Figure 8). Les autres segments peuvent aussi jouer un rôle important mais peu d'études ont validé leur impact. En revanche l'impact du signal tonique est largement influencé par les segments de signalisation, le signal tonique du 4-1BB ayant montré une boucle de signaux pro-apoptotique passant par TRAF2.

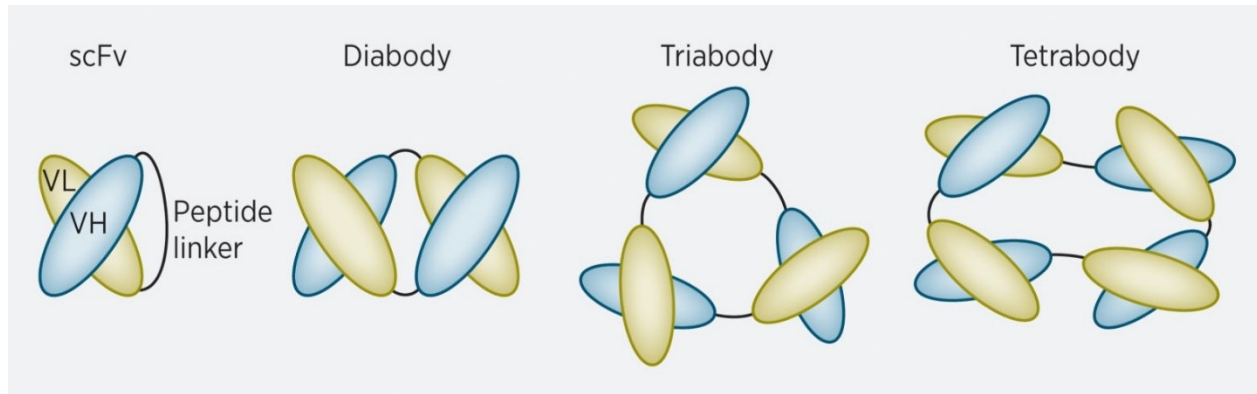


Figure 8. – Schéma de liaison de scFv entrainant un signal tonique

(adapté de Ajina A, Maher J. Strategies to Address Chimeric Antigen Receptor Tonic Signaling. Mol Cancer Ther. ©2018;17(9):1795–1815, with permission from AACR.)

Le signal tonique est présent car la densité de molécules en surface est supra-physiologique. En effet les vecteurs rétroviraux utilisés utilisent soit un promoteur interne viral soit un promoteur eucaryote fort comme EF1 α . Ces promoteurs induisent une production supra-physiologique de CAR qui favorisent le signal tonique. L'expression du CAR a été modulée soit en ajoutant une séquence d'entrée ribosomique soit par des stratégies d'insertion spécifique dans des locus dirigeant l'expression de la chaîne α du TCR (411, 412). Ces travaux ont montré que bien que les niveaux de CAR détectés soient inférieurs l'efficacité du traitement étaient identique ou même supérieure *in vivo*. Il est donc supposé que la diminution de l'intensité d'expression est un paramètre crucial pour obtenir une thérapie plus efficace en diminuant le signal tonique.

3.5.7. L'utilisation des NK dans la thérapie CAR

Comme il a été montré plus haut, les cellules T mais aussi les cellules NK sont les principaux types cellulaires capables de détruire les cellules cancéreuses. Il a été montré largement que les cellules NK pouvaient aussi bien répondre aux signaux transmis par les CAR et à ce titre sont un vecteur tout aussi valable de la thérapie CAR (413). Leur pouvoir cytotoxique leur permet une lyse très efficace même sans l'aide d'autres cellules immunitaires. L'utilisation de ces cellules comporte également plusieurs avantages.

Comme il a été dit plus haut, les NK intègrent plusieurs signaux notamment de stress des cellules avec lesquelles elles forment un contact. Le signal CAR peut à ce titre coopérer avec les autres signaux pour favoriser la réaction uniquement envers les cellules cancéreuses. Si les CAR de deuxième génération sont capables à eux-seuls de déclencher une activation NK, on peut imaginer utiliser les CAR de première génération ou des CAR optimisés pour les cellules NK pour favoriser encore plus la spécificité et préserver ainsi les tissus sains.

Un aspect majeur de la thérapie CAR-NK est qu'elle est totalement indépendante du MHC pour la reconnaissance. Les cellules NK ne déclenchent pas de réponse allogénique et il a donc été proposé de les utiliser en transfert adoptif entre différents individus. Cette approche a beaucoup d'avantages. Elle permettrait de générer des cellules pour un patient dont il est impossible de récupérer et d'amplifier un nombre suffisant de lymphocytes, comme il a été montré c'est parfois un facteur limitant de la thérapie. Le délai de traitement serait lui aussi largement diminué car il serait possible de préparer des cellules et de les congeler pour les utiliser quasiment immédiatement. Le coût de traitement serait également diminué car la nécessité d'utilisation des cellules du patient apporte de grosses contraintes techniques qui augmentent le prix du traitement.

Cependant des facteurs techniques limitent l'utilisation des cellules NK. Les méthodes d'amplifications, bien qu'efficaces, sont plus récentes et moins standardisées. L'utilisation de cellules nourrices dans ces protocoles est aussi une problématique pour la génération de produits cellulaires admissibles en clinique bien qu'elle ne l'interdise pas (296). Néanmoins, un défaut majeur des cellules NK est leur résistance à la transduction rétrovirale. Les taux de transduction observés dans les cellules T permettent une utilisation de la quasi-totalité des cellules initiales alors que les cellules NK, qui représentent déjà une plus faible proportion des lymphocytes sanguins, ne pourront toutes être transduites, ce qui diminuera le nombre de cellules dans le produit cellulaire final. L'utilisation des cellules NK est donc plus complexe. Certaines études ont tout de même

prouvé la possibilité de leur utilisation et ont pu démontrer leur efficacité clinique avec un CAR (414, 415). En utilisant des cellules NK amplifiées à partir de sang de cordon, il a été possible de produire des quantités suffisantes de NK exprimant un CAR. En ajoutant à la construction le gène de l'IL-15 pour favoriser l'amplification in vivo des NK, les résultats cliniques ont démontré l'efficacité des cellules NK dans la thérapie CAR. Plus de la moitié des patients enrôlés dans les tests ont obtenu une rémission complète sans aucun signe de syndrome de relargage cytokinique, prouvant les avantages des NK.

Les CAR ont donc révolutionné le traitement du cancer alors qu'il s'agit d'une technologie très récente et qui est encore à explorer. De nombreuses améliorations sont encore à apporter, comme l'optimisation des cibles pour avoir la possibilité de les utiliser dans chaque cancer aussi bien pour la leucémie que les cancers solides, ou les fragments de signalisation qui permettraient une survie améliorée des cellules, tout en limitant le syndrome de relargage cytokinique. La présente étude s'intéresse aux types cellulaires utilisés pour la thérapie CAR pour en améliorer l'efficacité et éviter toute rechute.

4. Hypothèse et objectifs

Comme montré jusqu'ici, l'immunothérapie est une voie thérapeutique très prometteuse dans le traitement des cancers et en particulier contre la leucémie. La technologie des CAR a changé complètement la vision des traitements et a ouvert la voie à des thérapies innovantes, des thérapies cellulaires et géniques, qui permettent de dépasser de loin les possibilités du corps mais aussi les composés pharmacologiques classiques. La spécificité et la performance de ce traitement sont les caractéristiques qui manquaient jusqu'ici aux options thérapeutiques comme la chimiothérapie ou la greffe de HSC.

Malgré cela, cette thérapie n'est pas exempte de défauts. Le syndrome de relargage cytokinique qui résulte de l'infusion d'une grande quantité de cellules T activées qui vont répondre au signal CAR reste une menace pour la vie du patient et nécessite dans certains cas de diminuer l'activation

des cellules thérapeutiques compromettant possiblement l'efficacité du traitement. Malgré une réponse initiale souvent très positive le traitement CAR ne permet toujours pas d'achever une rémission complète stable à long terme. Ce traitement étant basé sur le génie génétique et la manipulation *ex vivo* de cellules, de nombreuses pistes pour améliorer la thérapie CAR sont ouvertes.

Durant ma thèse, la voie qui a été choisie est l'utilisation de nouveaux types cellulaires comme vecteurs de la thérapie CAR. Comme vu plus haut les cellules NK, bien que centrales dans la lutte anti-tumorale, sont largement moins utilisées dans cette thérapie. Les problèmes techniques qui viennent avec leur utilisation ont jusqu'ici limité leur utilisation, mais de plus en plus de protocoles permettent d'envisager l'utilisation des NK comme produit de thérapie cellulaire au même titre que les cellules T.

Certaines études ont montré la possibilité d'utiliser les cellules souches comme vecteur de la thérapie CAR dans une approche plus similaire aux thérapies géniques classiques visant à rétablir la fonction d'un gène. Cette stratégie permettrait de produire en continu des cellules thérapeutiques *in vivo* surpassant ainsi les problématiques de production de cellules à infuser en grande quantité et d'épuisement cellulaire et de disparition des CAR T. Bien que très intéressante cette option thérapeutique apporte de nombreuses questions quant à l'effet du CAR sur les populations de cellules souches et de toutes les cellules qui en découlent. L'expression d'un CAR pourrait interférer avec le développement des diverses population ou compromettre leur fonction physiologique.

Cette possibilité nous a amené à trouver une solution à la problématique du contrôle de l'expression. Si l'expression du CAR par toutes les populations hématopoïétiques pourrait ne pas poser de problème majeur, une option pour tout de même limiter l'impact de ce transgène est de limiter son expression aux populations cellulaires désirées, en l'occurrence les cellules T et NK. Pour cela l'utilisation d'un promoteur spécifique est la meilleure option. Les cellules bien que toutes porteuses du transgène n'activeront pas toutes le gène du CAR. L'utilisation d'un tel promoteur a d'autres avantages, le niveau d'expression peut être plus proche d'un niveau physiologique d'un récepteur naturel. Ce niveau d'expression est crucial comme vu plus haut pour le signal tonique et le diminuer peut potentiellement améliorer l'effet *in vivo* du traitement CAR.

Un autre avantage est le risque moindre d'activation d'oncogène proche du site d'intégration du transgène (416).

Bien que de nombreux promoteurs soient caractérisés et spécifiques, les contraintes de la transduction imposent d'utiliser une séquence promotrice courte. La production de virus recombinant limite la taille du transgène et plus celle-ci est longue plus l'efficacité de production de virus sera réduite (417). L'étude des promoteurs endogènes a permis de déterminer des séquences régulatrices spécifiques de certains types cellulaires (418, 419). Cependant, aucune de ces séquences ne correspond aux critères imposés par la transduction lentivirale, à savoir une taille de séquence réduite (420). De plus, la génération de promoteur spécifiques est une tâche complexe car la transcription peut être trop faible pour être détectée mais toujours présente et poser des problèmes de génotoxicité ou d'immunogénicité (421).

Pour pallier à ce problème la génération de nouveaux promoteurs basés sur des données de génomique transcriptionnelle récentes représente une opportunité afin de développer un outil qui permettrait une utilisation des HSC en immunothérapie.

4.1. Hypothèse

L'hypothèse de travail des travaux présentés ici est que le développement d'approches d'immunothérapie par les CAR dans de nouvelles populations cellulaires permettra l'amélioration de leur efficacité et pourrait résoudre les problèmes liés à la thérapie utilisant des cellules T.

4.2. Objectifs

Ce projet s'organise autour de deux objectifs principaux, l'utilisation d'un côté des cellules NK et de l'autre des cellules souches hématopoïétiques dans la thérapie CAR ayant eux même les sous-objectifs suivants :

- 1) Optimisation de l'utilisation des cellules NK dans la thérapie CAR :

1.1 - Mise au point d'une méthode de transduction lentivirale efficace des NK

1.2 - Validation de cette méthode pour la production d'un grand nombre de NK modifiées sans fonctionnalité altérée

1.3 - Preuve de concept de l'utilisation de cette méthode pour la thérapie CAR et l'utilisation de constructions génétiques intégrant plusieurs transgènes

2) Mise en place d'une stratégie de thérapie CAR utilisant les HSC :

2.1 - Création d'un promoteur spécifique pour diriger l'expression du CAR uniquement sur les cellules T ou NK

2.2 - Validation de ce promoteur pour l'utilisation d'un CAR

2.3 - Preuve de concept de l'efficacité de cette approche

Chapitre 2 – Premier article

1. Introduction du premier article

Étant donné la difficulté de transduire efficacement et de manière reproductible les cellules NK, leur utilisation en immunothérapie est rendue plus difficile. L'objectif de cet article est de mettre au point une méthode stable et efficace pour transduire les cellules NK avec des vecteurs lentiviraux. Dans cette optique les particules lentivirales ont été pseudotypées avec diverses protéines d'enveloppe avant d'être testées sur des cellules NK primaires fraîchement isolées ou après amplification *ex vivo* dans le système d'expansion et d'activation des NK (NKAES). L'utilisation de l'enveloppe BaEV a montré des taux de transductions significativement plus élevés que toutes les autres protéines d'enveloppe. Cette efficacité a été reliée à l'expression des récepteurs de cette enveloppe ASCT1 et ASCT2 par les NK. Pour démontrer l'efficacité de cette enveloppe dans le contexte d'une utilisation en immunothérapie, nous avons transduit les cellules NK amplifiées avec une construction de CAR de troisième génération ciblant l'antigène CD22 et démontré leur efficacité face à des cibles leucémiques résistantes aux NK n'exprimant pas de CAR. Pour démontrer que ce protocole permet une transduction de constructions génétiques plus longues, nous avons transduit les cellules NK avec une cassette comprenant deux CAR lié par une séquence autoclitante, l'un ciblant le CD22 et le second ciblant le CD19. Il a été possible de générer des cellules NK exprimant les deux CAR en grand nombre et il a été prouvé qu'elles étaient capables de lyser des cibles ayant perdu l'un des deux antigènes. Ces travaux ont démontré l'efficacité du protocole de transduction NK utilisant l'enveloppe BaEV ainsi que la possibilité d'utiliser ce protocole dans l'immunothérapie par les NK.

2. Premier article

Efficient And Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector

Aurelien B.L. Colamartino^{*1,2}, William Lemieux^{*1,2}, Panojot Bifsha², Simon Nicoletti^{2,3}, Nitin Chakravarti⁴, Joaquin Sanz Remon^{2,5,6}, Hugo Roméro², Silvia Selleri^{1,2}, Kathie Béland², Mélanie Guiot^{7,8}, Camille Tremblay-Laganière^{1,2}, Renée Dicaire², Luis Barreiro^{2,6}, Dean A. Lee⁹, Els Verhoeven^{10,11}, Elie Haddad^{1,2,12}

* Both authors contributed equally

1. Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, University of Montréal, QC, Canada; 2. CHU Sainte-Justine Research Center, Montréal, QC, Canada; 3. INSERM U1163 and CNRS ERL 8254, Medicine Faculty, Paris Descartes University, Necker Hospital, Paris, France; 4. Department of Medical Oncology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania, USA; 5. University of Montreal, Department of Biochemistry, Montreal, Qc, Canada ; 6. University of Chicago, Department of Medicine, Genetics Section, Chicago, Illinois, 60637, USA ; 7. UPMC Paris 6, Paris, France; 8. APHP, Paris, France; 9. Center for Childhood Cancer and Blood Disorders, Research Institute of Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio, USA; 10. CIRI – International Center for Infectiology Research, Team EVIR, Université de Lyon, Lyon, France; Inserm, U1111; Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France; Université Lyon 1; CNRS, UMR5308, Lyon, France; 11. Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France ; 12. Department of Pediatrics, University of Montréal , QC, Canada.

Running title: Efficient and robust NK-Cell transduction with BaEV

DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST

E. Verhoeyen has a patent EP2761010 licensed to Lentigen Inc./Miltenyi. The other authors declared that they have no conflict of interest.

Word count: 1,360 words

ABSTRACT

NK-cell resistance to transduction is a major technical hurdle for developing NK-cell immunotherapy. By using Baboon envelope pseudotyped lentiviral vectors (BaEV-LVs) encoding eGFP, we obtained a transduction rate of $23.0 \pm 6.6\%$ (mean \pm SD) in freshly-isolated human NK-cells (FI-NK) and $83.4 \pm 10.1\%$ (mean \pm SD) in NK-cells obtained from the NK-cell Activation and Expansion System (NKAES), with a sustained transgene expression for at least 21 days. BaEV-LVs outperformed Vesicular Stomatitis Virus type-G (VSV-G)-, RD114- and Measles Virus (MV)- pseudotyped LVs ($p < 0.0001$). mRNA expression of both BaEV receptors, ASCT1 and ASCT2, was detected in FI-NK and NKAES, with higher expression in NKAES. Transduction with BaEV-LVs encoding for CAR-CD22 resulted in robust CAR-expression on $38.3\% \pm 23.8\%$ (mean \pm SD) of NKAES cells, leading to specific killing of NK-resistant pre-B-ALL-RS4;11 cell line. Using a larger vector encoding a dual CD19/CD22-CAR, we were able to transduce and re-expand dual-CAR-expressing NKAES, even with lower viral titer. These dual-CAR-NK efficiently killed both CD19^{KO}- and CD22^{KO}-RS4;11 cells. Our results suggest that BaEV-LVs may efficiently enable NK-cell biological studies and translation of NK-cell-based immunotherapy to the clinic.

INTRODUCTION

The relative resistance of NK cells to transduction hampers the study of NK-cell biology and the development of NK cell-based immunotherapy. VSV-G-LVs, classically used to generate chimeric antigen receptor (CAR)-T cells,(Levine et al., 2006) do not efficiently transduce NK-cells. RD114-pseudotype viral vectors represent an attractive alternative since their entry receptor, the sodium-dependent neutral amino acid transporters (ASCT2),(Rasko et al., 1999; Marin et al., 2003) is widely expressed in the hematopoietic lineage.(Sandrin et al., 2002) However, despite encouraging initial report, RD114-based viral vectors only transduce NK-cells at low levels. Nevertheless, they recently enabled clinical development of cord-blood derived CAR-NK-cells.(Liu et al., 2018) To fill the need for an efficient method for transducing NK cells, we investigated alternative pseudotyping proteins. Since the Baboon envelope pseudotyped lentiviral vector (BaEV-LV) binds ASCT1(Girard-Gagnepain et al., 2014) in addition to ASCT2 for viral entry, we assessed their efficacy to transduce NK-cells for therapeutic purposes. As observed independently by Bari *et al*, (Bari et al., 2019) our data demonstrate the efficacy of BaEV-LV in NK-cell transduction.

METHODS

Cells and Culture Condition

Blood samples were obtained from healthy volunteers after informed consent (IRB-approved protocol #CER-3527). NK-cells were enriched from PBMC using a CD56-positive selection kit (Stemcell Technologies, Canada). NK cells were expanded using the Amplification and Expansion System (NKAES) with irradiated K562mbIL21 or K562mbIL15 feeder cells as described. (Fujisaki et al., 2009; Denman et al., 2012) Alternatively, NK-cells were amplified using NK-MACS

Medium (130-114-429, Miltenyi) system according to manufacturer's instructions. RS4;11 (ATCC) CD19/22^{KO} were generated using purified Cas9 protein and two gRNA targeting CD19 or CD22 (IDTDNA). CD19^{KO} and/or CD22^{KO} cells were FACS-sorted based on loss of surface marker expression. Cells were cultured in DMEM (Wisent) or RPMI1640 supplemented with 10% FCS and penicillin/streptomycin (Gibco). Media were supplemented with 200 UI/mL IL-2 (Proleukin – Novartis Pharmaceuticals, Canada) for NK-cell cultures.

Plasmids and Viral production

An UCOE sequence (Muller-Kuller et al., 2015) was added to the lentiviral vector pHRSIN-SFFV-eGFP (Levy et al., 2017) upstream of the SFFV promoter to produce pHUS-GFP vector. For the CAR-expression vector, GFP in pHUS-GFP was replaced by an anti-CD22 CAR (m971 ScFv) fused to 28BBz constructed from 28z and BBz (Dr. Orentas, National Cancer Institute) (Hase et al., 2013). For the dual CAR-expression vector, the GFP-cassette was replaced by two second-generation anti-CD19 and anti-CD22 CARs, separated by a self-cleaving T2A peptide (Figure 3A). The pMD2.G (VSV-G) was a gift from Didier Trono (Addgene plasmid#12259; <http://n2t.net/addgene:12259>; RRID:Addgene_12259) and pLTR-RD114A (Zhang et al., 2004) (RD114) was a gift from Jakob Reiser (Addgene plasmid#17576; <http://n2t.net/addgene:17576>; RRID:Addgene_17576). The Measles virus (MV-LV) and BaEVRless envelope plasmids were used as previously described (Girard-Gagnepain et al., 2014). Titration was performed on HEK293T cells (ATCC) using serial virus dilutions. (Girard-Gagnepain et al., 2014)

Viral transduction

NKAES were transduced after one week of expansion. One day before transduction, a 12-well plate was coated with RetroNectin (Takara). The following day, concentrated vectors at indicated multiplicity of infection (MOI), were added to coated plates for 4 hours at 37°C. Then NK cells

were seeded in these wells in IL-2-supplemented medium and protamine sulfate (Pharmaceutical Partners of Canada Inc) (8 ug/mL). The plates were then centrifuged at 1000g for 1 hour and incubated at 37°C overnight. The next day, IL-2-supplemented medium was added to each well. Transduction was assessed on day 3 or day 5 after transduction for NKAES and freshly isolated NK-cells (FI-NK), respectively.

Flow cytometry

All samples were stained with anti-CD56-APC, anti-CD3-FITC (Biolegend) and 7AAD (BD Biosciences). Transgene expression was detected by flow cytometry on 7AAD⁻ CD56(-APC)⁺ CD3(-PE)⁻ cells (Biolegend). For NK-cell receptors detection, samples were stained with DAPI, CD56-BV711, CD16-BV786, NKp30-AF647, NKp44-PE, NKp46-BV421 (Biolegend), NKG2D-APC (BD Biosciences) and NKG2A-PE (Miltenyi Biotec). CD3-BV650 and CD19-APC-Cy7 (Biolegend) markers were used as a gating exclusion strategy for the NK cell staining. Receptor expression was assessed on DAPI⁻ CD56(-BV711)⁺ CD3(-BV650)⁻ cells. To detect CAR-expression, cells were incubated with 2 µl Siglec2(CD22)-Fc chimera (50 mg/ml, R&D) for 30 minutes at 4°C, washed and stained with anti-Fc-PE (Jackson Immune).

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was assessed 24 hours after cell contact by flow cytometry. Targets cells were loaded with PKH26 dye (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's directives and seeded in 96 well round bottom plates. Effector cells were then added at different effector:target ratios and medium alone was added to control wells. Before acquisition, 7AAD was added to each well to discriminate dead cells. The cytotoxicity was calculated as: $\text{Cytotoxicity (\%)} = [1 - \text{live targets (sample) / live targets (control)}] \times 100\%$.

mRNA quantification

RNA-seq expression studies were independently performed in two laboratories (Accession #GSE128696, #GSE129044). For the FI-NK versus IL-21-NKAES/IL-15-NKAES comparisons, extraction of total RNA was done using the RNeasy mini kit (Qiagen) and Total RNA Purification Plus Kit (Norgen Biotek), respectively. The quality of RNA was verified with 2100 Bioanalyzer (Agilent) prior to preparation of sequencing libraries with the TruSeq RNA Sample Prep v2 Kit. Quality of libraries was verified via Agilent 4200 TapeStation using a High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay kit. For the IL-15 NKAES analysis, approximately 60-80 million paired-end 150bp sequence reads per library were generated, whereas for the IL-21 NKAES analysis, 30 million single-end 101 bp sequence reads per library were generated, both using Illumina HiSeq4000 platform. Kallisto, an RNA quantification program based on pseudoalignment was used to obtain read count estimates per gene.(Bray et al., 2016) The differential gene expression analysis was done using DESeq2, edgeR and limma R packages.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM 8.0 (GraphPad Software). Statistical significance was determined by one-way or 2-way ANOVA with multiple testing and Bonferoni correction or using simple multiple T tests with Holm-Sidak correction.

Study approval

Blood samples were obtained from healthy volunteers after informed and written consent. The study was approved by the institutional ethical board of the CHU Sainte-Justine (approved protocol #CER-3527).

RESULTS AND DISCUSSION

We first transduced NK cells expanded using the Amplification and Expansion System (NKAES) and freshly isolated NK-cells (FI-NK) with an eGFP-encoding LV and observed that in both cases, BaEV-LVs outperformed VSV-G-, MV-, and RD114- LVs (Figure 1A, 83.4 % mean transduction rate vs 15.7%, 13.7% and 37.8% for NKAES, $p < 0.0001$, and 23.0% vs 10.4%, 2.1% and 7.8% for FI-NK, $p < 0.0001$, respectively). The mean fluorescence intensity (MFI) of GFP after transduction in NK cells was similar for BAEV, VSV-G and RD114 and significantly lower for MV-LV in NKAES (Fig 1-B). The mean transduction rate with BaEV-LVs was higher than 60% for NKAES even at low MOI of 1, and ranged from 12.4% at a MOI of 1 to a maximum of 27.2% at a MOI of 10 for FI-NK (Figure 1C). Transgene expression persisted over time after transduction with BaEV-LVs, although a decrease was observed from 70.6% to 61.4% in 14 days for NKAES ($p=0.06$). Transduced FI-NK could be easily amplified after transduction (not shown). High transduction rates were also observed after NK-cell expansion on K562-mbIL15-41BBL feeder cells (Fujisaki et al., 2009) or feeder-free NK MACS medium (Kloss et al., 2017) (Figure 1D).

NK-cell receptors expression was assessed on untouched and BaEV-LV treated NKAES, which were either transduced (GFP+) or non-transduced (GFP-) (Figure 1E). There was no difference in CD56, CD16, NKG2D, NKG2A, NKp30, NKp44 and NKp46 receptors expression, suggesting that those markers are neither linked to the transduction efficiency, nor affected by the transduction (Figure 1E), unlike what has been recently reported (Bari et al., 2019). This difference could be attributed to the different expansion system used in our study.

The number of recovered living cells in both NKAES and FI-NK was preserved after transduction with BaEV-LVs (Figure 2A) although MV-LV transduction on NKAES yielded more living recovered cells than BaEV-LV transduction ($p < 0.05$). Although the percentage of dead cells in

culture was low for all conditions (Figure 2B), it was higher in NKAES transduced with MV-LV and RD114-LV as compared to BaEV ($p<0.01$ and $p<0.05$ respectively). Together these results suggest that BaEV-LV transduction did not affect viability nor NK-cell proliferation.

We then assessed whether NK-cell cytotoxic function was preserved after BaEV-LV transduction and confirmed that the cytotoxicity of eGFP-transduced NKAES cells against K562 cells was equivalent to non-transduced NKAES (Figure 2C-D).

RNAseq analyses of both FI-NK and NKAES showed that ASCT1 and ASCT2 mRNAs were detected at significantly higher frequency in both IL-15- and IL-21-NKAES than in FI-NK (Figure 2E-F), which may explain the higher transduction rate of NKAES. These data were confirmed by qPCR (not shown). Also, the expression of both BaEV receptors by NK cells may explain the higher transduction efficacy of BaEV-LVs as compared to RD114 which use only one of those receptors.

CAR-expressing NK-cells represent one of the most relevant clinical applications of efficient NK-cell transduction. We first tested a single 3rd generation CAR construct recognizing CD22 (Figure 3A). We obtained a transduction rate of $38.3\% \pm 23.8\%$ (mean \pm SD) of NKAES and a high sustained level of CAR-expression ($58.4\% \pm 7.8\%$; mean \pm SD) after sorting and re-expansion (Figure 3B-C). We demonstrated that CD22-CAR-NK-cells efficiently and specifically killed B-ALL RS4;11 target cells, which were resistant to untransduced NKAES (Figure 3D). We could obtain 5×10^8 CAR-expressing cells from 5×10^5 transduced cells after an expansion of 14 days (not shown). Since transgene size affects transduction efficacy, (al Yacoub et al., 2007; Cante-Barrett et al., 2016) we also tested a dual CAR-expressing vector with two independent chains recognizing CD19 and CD22. The length of the dual CAR-CD22/19 LV had a significant impact on virus production and NK transduction was lower ($23.1\% \pm 20.5\%$; mean \pm SD) (Figure 3E-F). However, we were able to

sort and re-expand these dual-CAR-transduced NK-cells for two weeks, keeping the transgene expression at a high level ($79.0\% \pm 8.7\%$; mean \pm SD) (Figure 3E). These CAR-CD22/19-NKAES killed efficiently CD19^{KO} or CD22^{KO}-RS4;11 cells, which suggest that this strategy could be efficient for preventing tumor evasion to CAR therapy (Jacoby et al., 2016; Ruella and Maus, 2016) (Figure 3G).

In this study we showed that BaEV-LV is an efficient and robust tool to transduce NK cells. As a proof-of-concept, we generated large numbers of engineered CAR-NK-cells, which induced specific killing of antigen-bearing cancer cells, even with a large dual CAR-LV construct. This technique was robust and reproducible in different expansion systems, including a feeder-cell-free system. The higher level of transduction could open up possibilities for the use of this method to generate an immunotherapeutic product. The prevalence of receptors, as seen by RNAseq, could explain the difference seen between the transduction of activated and resting NK cells. The fact that activated NK cells express both entry receptors at high level could also explain why this envelope protein is more efficient than the others. The development of such a tool could have a major impact on both basic research of NK-cell biology study and NK-cell-based immunotherapy.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.C., W.L., P.B., S.N., H.R., S.S., and M.G. performed the experiments. A.C., W.L., P.B. and K.B. wrote the manuscript. N.C. and D.A.L. generated the RNAseq data on IL-21 expanded NKAES cells and participated in the redaction of the manuscript. R.D. recruited participants and collected samples. E.H. generated the hypotheses, conceptualized the study and wrote the manuscript. E.V provided BaEVTRless encoding plasmid, discussed results and wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Dario Campana (St. Jude Children's Research Hospital) for the K562-mbIL15-41BBL cell line, and Dr. Rimas J. Orentas from the National Cancer Institute for the CAR-CD22 construct. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (#PJT-156347 and # 130246), from the "Fonds d'innovation thérapeutique (FIT)" of the "Fondation Charles Bruneau", and from the "Bank of Montreal" chair in pediatric immunology to E.H. W.L. is supported by a "Fonds de Recherche en Santé du Québec" (FRQS) scholarship award and A.C. by the Cole Foundation scholarship award. S.N. was supported by the Fondation Bettencourt-Schueller ("Ecole de l'INSERM-Liliane Bettencourt") and a fellowship from the « Fondation ARC pour la recherche sur le cancer ». E.V. was supported by Lentigen/Miltenyi Inc. (Boro Dropulic) for this study. This manuscript has been released as a Pre-Print at bioRxiv (Colamartino et al., 2019).

REFERENCES

- al Yacoub, N., Romanowska, M., Haritonova, N., and Foerster, J. (2007). Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts. *J Gene Med* 9(7), 579-584. doi: 10.1002/jgm.1052.
- Bari, R., Granzin, M., Tsang, K.S., Roy, A., Krueger, W., Orentas, R., et al. (2019). A Distinct Subset of Highly Proliferative and Lentiviral Vector (LV)-Transducible NK Cells Define a Readily Engineered Subset for Adoptive Cellular Therapy. *Front Immunol* 10, 2001. doi: 10.3389/fimmu.2019.02001.
- Bray, N.L., Pimentel, H., Melsted, P., and Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* 34(5), 525-527. doi: 10.1038/nbt.3519.
- Cante-Barrett, K., Mendes, R.D., Smits, W.K., van Helsdingen-van Wijk, Y.M., Pieters, R., and Meijerink, J.P. (2016). Lentiviral gene transfer into human and murine hematopoietic stem cells: size matters. *BMC Res Notes* 9, 312. doi: 10.1186/s13104-016-2118-z.
- Colamartino, A.B.L., Lemieux, W., Bifsha, P., Nicoletti, S., Chakravarti, N., Remon, J.S., et al. (2019). Efficient and robust NK-Cell transduction with Baboon Envelope pseudotyped lentivector: a major tool for immunotherapy. *bioRxiv*, 625285. doi: 10.1101/625285.
- Denman, C.J., Senyukov, V.V., Somanchi, S.S., Phatarpekar, P.V., Kopp, L.M., Johnson, J.L., et al. (2012). Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One* 7(1), e30264. doi: 10.1371/journal.pone.0030264.
- Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., Imai, C., Ma, J., Lockey, T., et al. (2009). Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* 69(9), 4010-4017. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3712.
- Girard-Gagnepain, A., Amirache, F., Costa, C., Levy, C., Frecha, C., Fusil, F., et al. (2014). Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood* 124(8), 1221-1231. doi: 10.1182/blood-2014-02-558163.
- Haso, W., Lee, D.W., Shah, N.N., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C.M., Pastan, I.H., et al. (2013). Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 121(7), 1165-1174. doi: 10.1182/blood-2012-06-438002.
- Imai, C., Iwamoto, S., and Campana, D. (2005). Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood* 106(1), 376-383. doi: 10.1182/blood-2004-12-4797.
- Jacoby, E., Nguyen, S.M., Fountaine, T.J., Welp, K., Gryder, B., Qin, H., et al. (2016). CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity. *Nat Commun* 7, 12320. doi: 10.1038/ncomms12320.
- Kloss, S., Oberschmidt, O., Morgan, M., Dahlke, J., Arseniev, L., Huppert, V., et al. (2017). Optimization of Human NK Cell Manufacturing: Fully Automated Separation, Improved Ex Vivo Expansion Using IL-21 with Autologous Feeder Cells, and Generation of Anti-CD123-CAR-Expressing Effector Cells. *Hum Gene Ther* 28(10), 897-913. doi: 10.1089/hum.2017.157.
- Levine, B.L., Humeau, L.M., Boyer, J., MacGregor, R.R., Rebello, T., Lu, X., et al. (2006). Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(46), 17372-17377. doi: 10.1073/pnas.0608138103.

- Levy, C., Amirache, F., Girard-Gagnepain, A., Frecha, C., Roman-Rodriguez, F.J., Bernadin, O., et al. (2017). Measles virus envelope pseudotyped lentiviral vectors transduce quiescent human HSCs at an efficiency without precedent. *Blood Adv* 1(23), 2088-2104. doi: 10.1182/bloodadvances.2017007773.
- Liu, E., Tong, Y., Dotti, G., Shaim, H., Savoldo, B., Mukherjee, M., et al. (2018). Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia* 32(2), 520-531. doi: 10.1038/leu.2017.226.
- Marin, M., Lavillette, D., Kelly, S.M., and Kabat, D. (2003). N-linked glycosylation and sequence changes in a critical negative control region of the ASCT1 and ASCT2 neutral amino acid transporters determine their retroviral receptor functions. *J Virol* 77(5), 2936-2945.
- Muller-Kuller, U., Ackermann, M., Kolodziej, S., Brendel, C., Fritsch, J., Lachmann, N., et al. (2015). A minimal ubiquitous chromatin opening element (UCOE) effectively prevents silencing of juxtaposed heterologous promoters by epigenetic remodeling in multipotent and pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res* 43(3), 1577-1592. doi: 10.1093/nar/gkv019.
- Rasko, J.E., Battini, J.L., Gottschalk, R.J., Mazo, I., and Miller, A.D. (1999). The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5), 2129-2134.
- Ruella, M., and Maus, M.V. (2016). Catch me if you can: Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies. *Comput Struct Biotechnol J* 14, 357-362. doi: 10.1016/j.csbj.2016.09.003.
- Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Negre, D., Le Grand, R., et al. (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 100(3), 823-832. doi: 10.1182/blood-2001-11-0042.
- Zhang, X.Y., La Russa, V.F., and Reiser, J. (2004). Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins. *J Virol* 78(3), 1219-1229.

TABLES

None

FIGURE LEGENDS

Figure 1. BaEV-LV efficiently transduces expanded (NKAES) and freshly isolated NK-cells (FI-NK). (A) Transduction of NK Amplify and Expansion System (NKAES) cells (K562mbIL15 system, left panel-in blue) or FI-NK (right panel- in red) using VSV-G (n=3 and n=6), Measles virus (MV; n=3 each), RD114 (n=7 and n=6) or BaEV (n=8 and n=12) envelope pseudotyped LVs encoding eGFP at a MOI of 10. Fluorescence was evaluated by flow cytometry (****P<0.0001 for both NKAES and FI-NK; one-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction). On the middle panels are shown representative flow cytometry plots of GFP expression after NK-cell transduction with BaEV-LVs (untransduced, middle left; transduced, middle right). (B) Mean fluorescence intensity for GFP expression in NKAES cells (K562mbIL15 system, left panel-in blue) or FI-NK (right panel-in red) using VSV-G (n=3 and n=6), Measles virus (MV; n=3 each), RD114 (n=3 and n=6) or BaEV (n=8 and n=12) envelope pseudotyped LVs encoding eGFP. Fluorescence was evaluated by flow cytometry (***p<0.001 and p=0.0882 for NKAES and FI-NK respectively; one-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction). (C) Transduction of NKAES (left panel-blue; n=5) or FI-NK (right panel-red; n=3) using BaEV-LV-encoding eGFP at various multiplicities of infection (MOI) was measured by fluorescence. (D) BaEV-LV transduction of NKAES using K562mbIL21 or K562mbIL15 irradiated feeder cells (n=4), or using the NK-MACS Medium (p=0.4265; one-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction, n=3). (E) Left panel: Flow cytometry plot representative of NK cell markers expression after NK-cell transduction with BaEV-LVs. Transduced (GFP positive) NKAES are in blue and non-transduced (GFP negative) NKAES are in red. Right panel: Mean fluorescence intensity for NK cell markers for untouched and BaEV-LV treated NKAES. BaEV-LV treated NKAES were gated according to GFP to separate transduced (GFP positive) or non-

transduced (GFP negative) NKAES ($p=0.2994$; 2-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction, $n=4$). Data are presented as the mean \pm SEM. For all experiments, NKAES and FI-NK were assessed at day 3 or day 5 post-transduction, respectively.

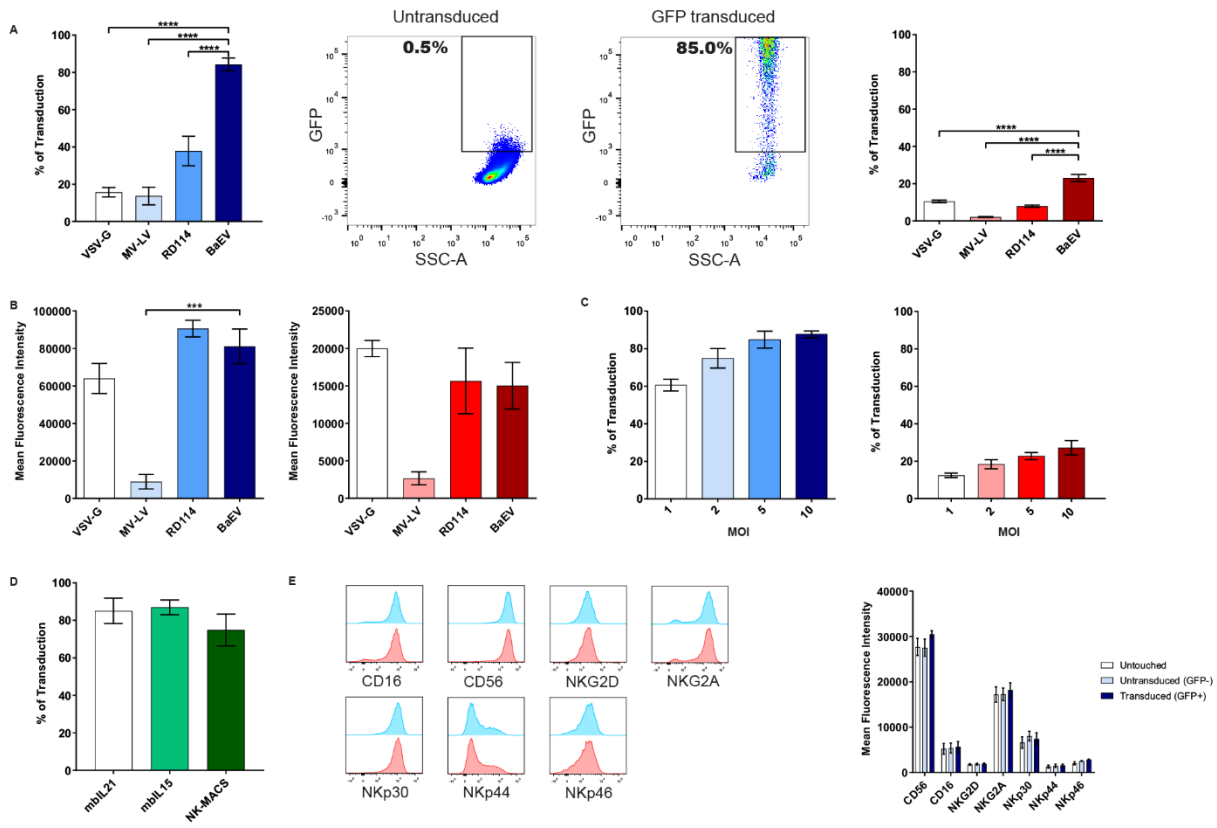
Figure 2. BaEV-LV transduction does not alter the phenotype or function of NK cells. (A)

Viability of NKAES (left panel; $n=3$) or FI-NK (right panel; VSV-G and MV-LV $n=6$, RD114 $n=3$, BaEV $n=9$) with different LVs was assessed via the ratio of living (7-AAD-negative) cells in the culture normalized to the initial number of cells before transduction ($*p<0.05$ and $p=0.141$ for NKAES and FI-NK respectively; one-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction). **(B)** Cell death, assessed by the percentage of 7-AAD positive cells, of NKAES (left panel; VSV-G, MV-LV and RD114 $n=3$, BaEV $n=8$) or FI-NK (right panel; VSV-G and RD114 $n=6$, MV-LV $n=3$, BaEV $n=12$) with different LVs. Percentage of 7-AAD positive cells was calculated by flow cytometry after debris exclusion ($*p<0.05$ and $**p<0.01$ for NKAES, and $p=0.14$ for FI-NK; one-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction). **(C)** Flow cytometry plot showing the gating strategy used in cytotoxicity experiments. Cells were first gated on forward and side scatter (FSC-A, SSC-A) and then the live 7-AAD negative cells were selected. Finally, PKH26 stained target cells were gated to numerate the remaining cells. **(D)** Cytolytic function of BaEV-LV-transduced vs untransduced NKAES cells against K562 target cells. Data represent the percentage of target lysis, assessed by flow cytometry relative to the effector/target ratio and normalized to targets alone. ($p=0.4012$; 2-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction; $n=3$). **(E)** Quantitative expression of the viral receptors mRNA assessed by RNA-seq in NKAES expanded with K562mbIL21 and in FI-NK-cells ($n=4$; $**p<0.01$, multiple T tests with Holm-Sidak correction). **(F)** Quantitative expression of the viral receptors

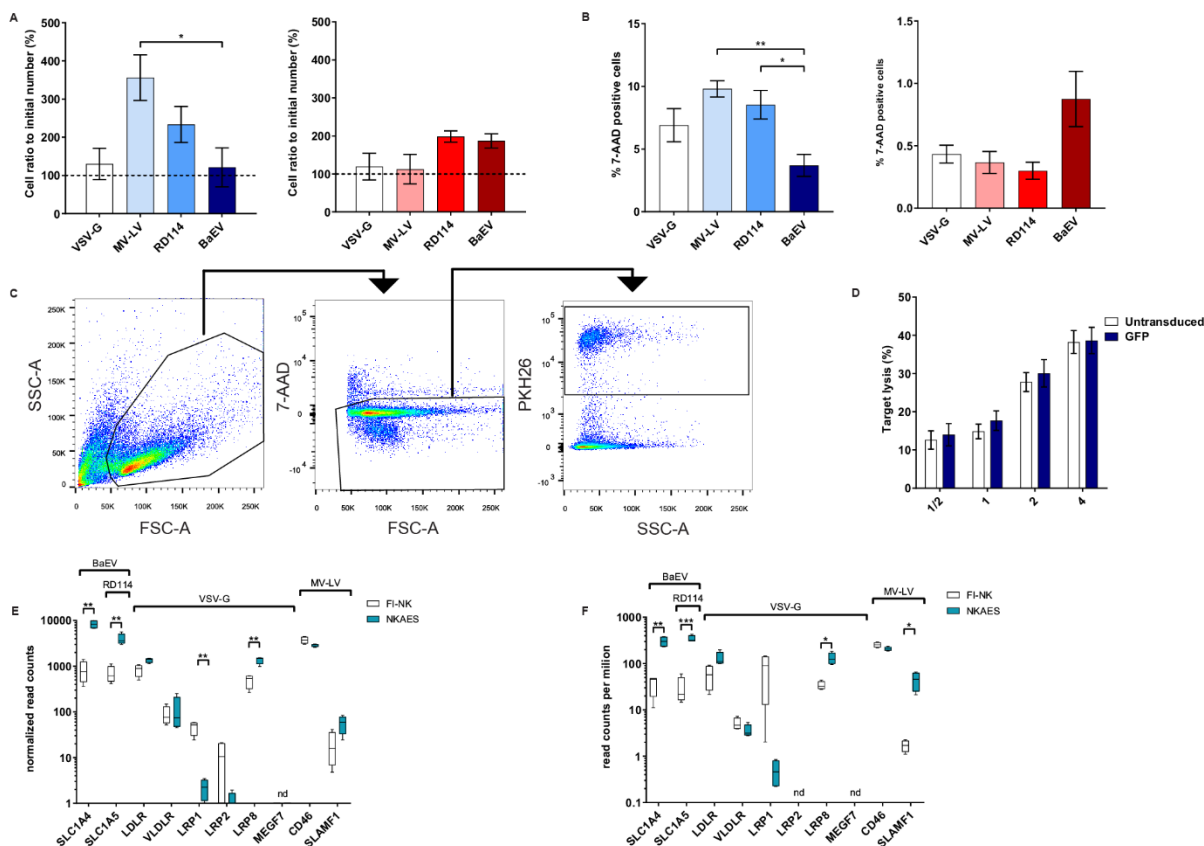
mRNA assessed by RNA-seq in NKAES expanded with K562mbIL15 and in FI-NK-cells (n=4; *p<0.05 ; **p<0.01, ***p<0.001, multiple T tests with Holm-Sidak correction). Data are presented as the mean \pm SEM, except where noted. For all experiments, NKAES and FI-NK were assessed at day 3 or day 5 post-transduction, respectively.

Figure 3. BaEV-LVs allow robust CAR-expression in NK-cells. (A) Schematic representation of the different LVs used for NK-cell transduction using BaEV-LV (relative scale according to size in base pairs). (B) Percentage of transduced NKAES cells using BaEV-LVs coding for an anti-CD22 CAR, assessed at day 3 after transduction (“transduced”; n=15) and after sorting and one week of re-expansion (“sorted/expanded”; n=3). (C) Flow cytometry plot representative of CAR-CD22 expression after NK-cell transduction with BaEV-LVs. (D) Cytotoxic assays of NKAES (either untransduced or CAR-CD22-NK-cells) against either parental (WT; n=7) or CD19/22^{KO}-RS4;11 cells (B-ALL; n=2) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; 2-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction). (E) Percentage of transduced NKAES cells using BaEV-LVs coding for the dual CAR assessed at day 3 after transduction (“transduced”; n=9) and after sorting and 2 weeks of re-expansion (“sorted/expanded”; n=3). (F) Flow cytometry plot representative of dual CAR expression after NK-cell transduction with BaEV-LVs. (G) Cytotoxic assays using NKAES cells transduced with a dual CAR (left panel) or untransduced NKAES (right panel) against either parental (WT; n=8 each), CD19^{KO} (n=3 for untransduced, n=4 for CAR transduced), CD22^{KO} (n=1 for untransduced, n=2 for CAR transduced) or CD19/CD22^{KO} RS4;11 B-ALL cells (n=3 for untransduced, n=5 for CAR transduced). Data are presented as the mean \pm SEM.

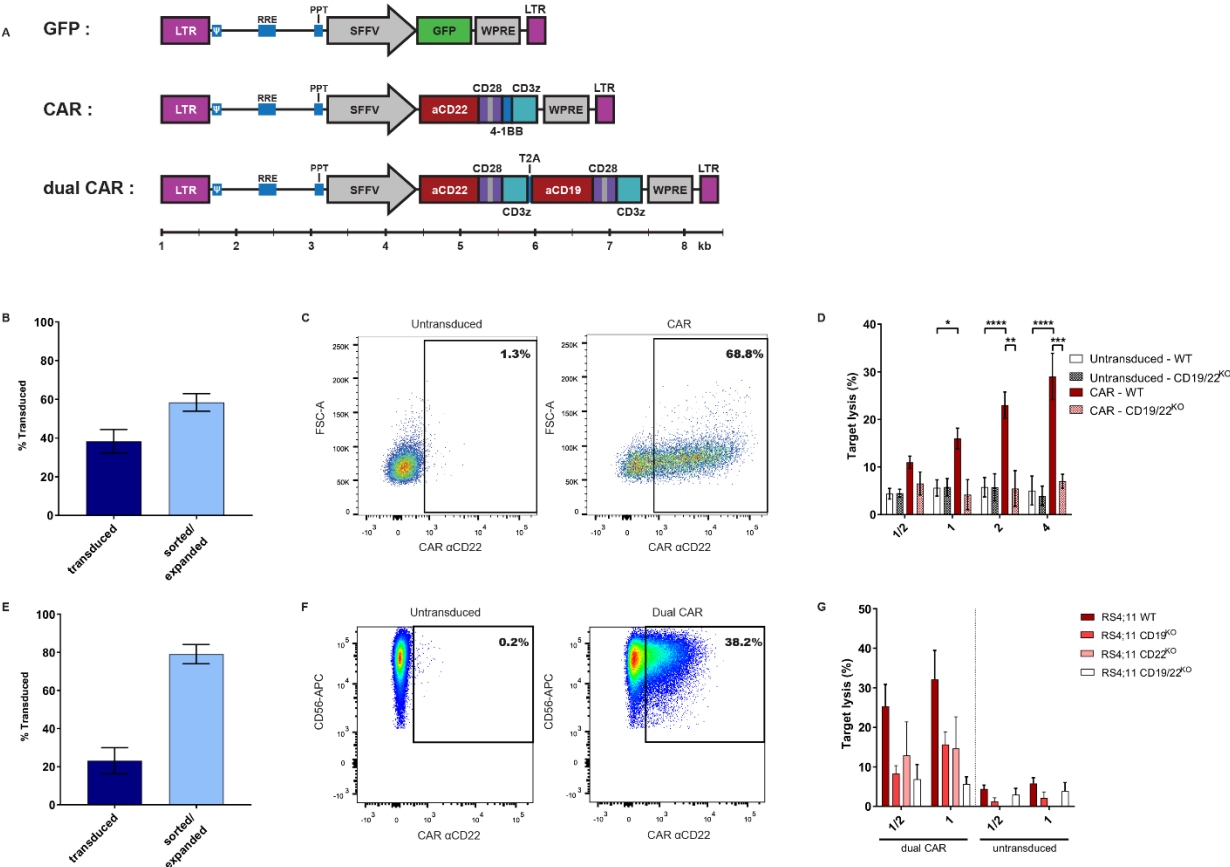
2.1. Figure 1



2.2. Figure 2



2.3. Figure 3



Chapitre 3 – Brevet

La seconde partie du travail de cette thèse est de mettre en place un protocole d'utilisation des HSC avec les CAR. La problématique amenée par cette stratégie est le patron d'expression pan-hématopoïétique du transgène. L'expression d'un CAR dans toutes les cellules descendantes des HSC greffées peut poser un problème de développement. Pour répondre à cette problématique nous avons envisagé de générer des promoteurs dirigeant une expression spécifique à un compartiment cellulaire, suffisamment courts pour être intégrés à des constructions lentivirales viables pour la thérapie génique. Cette approche nous a conduits à mettre au point une méthodologie pour l'isolation de séquences régulatrices et le clonage de ces séquences pour créer *de novo* des promoteurs spécifiques. Cette méthode, ainsi que la collection de promoteurs qui ont pu être déterminés avec, est décrite dans le brevet présenté en annexe (Numéro de demande internationale : CA2020050084). Parmi ces promoteurs un promoteur T, un promoteur NK ainsi qu'un promoteur B ont été validés *in vitro* et *in vivo*, démontrant l'efficacité de la méthodologie. Si l'optique initiale était une utilisation pour la thérapie CAR, les promoteurs générés peuvent être utilisés dans plusieurs autres contextes. Une des utilisations évidente serait dans un cadre de thérapie génique de maladies liées à des déficits immunitaires spécifiques nécessitant une expression restreinte à un type cellulaire. Une collection de promoteurs potentiels, générés par la méthode décrite, a donc été incluse dans ce brevet pour développer de futures applications tant de biologie fondamentale que thérapeutique.

Cette méthode innovante fait écho aux problématiques soulevées dans le domaine de la thérapie génique depuis plusieurs années. Si la possibilité d'utiliser des promoteurs de gènes connus et bien caractérisés chez la souris a permis de diriger l'expression des transgènes dans des sous-types cellulaires précis, la contrainte amenée par la thérapie génique empêche l'utilisation de ces promoteurs, souvent bien trop long pour être empaquetés dans un vecteur viral. La complexité des promoteurs de gènes connus peut rendre leur utilisation complexe de par l'importance de séquences régulatrices parfois très éloignées du site d'initiation de la transcription.

La génération de promoteurs plus compacts gardant une spécificité a donc été envisagée pour surpasser ce problème. En utilisant des séquences régulatrices courtes clonées en amont d'un promoteur minimal, il est possible d'obtenir une activation spécifique du transgène. Les études s'intéressant à la thérapie génique de l'hémophilie B ont montré la possibilité d'utiliser des promoteurs spécifiques en utilisant des portions de séquences du promoteur de la transthyrétine et des séquences synthétiques (421). Mais la spécificité imparfaite a nécessité l'ajout de séquences cibles de microARN. Plus récemment l'utilisation de séquences introniques du gène FOXP3 ont permis la génération d'un promoteur pour la thérapie génique du syndrome IPEX (422).

Une autre approche pour palier au problème d'expression spécifique utilise la technique de *Knock-in* pour intégrer la séquence du transgène directement dans un site génomique dont la régulation est connue. L'utilisation du locus du TCR α pour intégrer un CAR a été démontré comme efficace et permettait en parallèle d'abolir l'expression du TCR (412). Si dans ce contexte le KO est un effet recherché il peut être problématique dans d'autres situations. Cette approche utilisant l'outil CRISPR/Cas9 est aussi une réponse technique à cette même problématique de l'expression spécifique, cependant l'efficacité actuelle de *Knock-in* est faible et ne permet pas son utilisation dans tous les cas sans optimisation.

La méthode de génération de promoteurs présentée ici n'est donc pas le seul outil disponible mais elle répond bien aux contraintes de la thérapie génique et pourrait faciliter la mise en place de nouvelles thérapies.

Chapitre 4 – Deuxième article

1. Introduction du deuxième article

A l'aide de la technologie décrite dans le brevet au chapitre 3 nous avons développé et caractérisé plus en détail un promoteur spécifique des cellules T, le PIRATE. Ce promoteur a été testé en parallèle d'un promoteur spécifique des cellules B et d'un promoteur spécifique des NK. Cette validation a permis de montrer l'efficacité de la méthode de création de promoteur. Le promoteur PIRATE a montré une expression dans la différenciation T dès le stade pro-T. L'expression a été démontrée comme plus faible qu'un promoteur ubiquitaire contrôle et stable dans le temps en gardant une expression spécifique aux cellules T *in vivo*. L'application visée par cette thèse étant l'immunothérapie de la leucémie, cet article s'attache à prouver la possible utilisation du PIRATE dans le contexte de la thérapie CAR utilisant les HSC. Cet article démontre l'expression correcte avec la même cinétique et la même intensité du CAR. La validation de l'utilisation du CAR a permis de montrer que le niveau d'expression induit par le PIRATE n'empêche pas le fonctionnement du CAR en essai de cytotoxicité *in vitro* et que le CAR peut être exprimé correctement *in vivo* à la surface des cellules T dans un modèle murin humanisé BLT. Nous avons noté que lors de la différenciation *in vitro* de cellules T exprimant le CAR, les cellules transduites avec un promoteur fort diminuaient leur expression du CAR au cours de la culture alors que les cellules transduites avec le PIRATE avaient un niveau stable d'expression. Cet article étant en préparation nous sommes actuellement en train de répliquer les expériences pour atteindre une significativité statistique. Dans le contexte de la thérapie CAR nous prévoyons également d'injecter des cellules de lignée leucémique B dans les modèles murins humanisés pour valider la capacité du promoteur PIRATE à permettre aux cellules exprimant le CAR de contrôler une leucémie *in vivo*. Cet article est prévu pour publication dans *Science Translational Medicine*.

2. Deuxième article

New approach to build cell-specific promoter suitable for gene therapy, a proof of principle in hematopoietic stem cells

Single sentence summary: We developed and validated a new approach based on CAGE sequencing to generate new specific promoters for gene therapy.

Aurélien Colamartino^{1,2}, Panojot Bifsha², Chloé Colas^{1,2}, William Lemieux^{1,2}, Camille Tremblay-Laganière^{1,2}, Hugo Romero², Simon Nicoletti^{2,3,4}, Mélanie Guiot^{5,6}, Andrei Boldici^{1,2}, Yuanyi Li², Kathie Beland², Elie Haddad^{1,2,7*}

1. Microbiology, Infectiology and Immunology department, University of Montréal, Montréal, QC; 2. Charles-Bruneau Cancer Center, CHU Sainte-Justine Research center, Montréal, QC; 3. Paris Sud University, Medical Faculty, Le Kremlin-Bicêtre, France; 4. Imagine Institute, Sorbonne Paris Cité University, Necker Hospital, Paris, France; 5. UPMC Paris 6, Paris, France; 6. APHP, Paris, France; and 7. Department of Pediatrics, University of Montréal, Montréal, QC

* Corresponding author:

Elie Haddad, MD PhD

Department of Pediatrics, University of Montreal,

Immunology Division, CHU Sainte-Justine,

3175 Cote Sainte-Catherine, room 6.17.003

H3T 1C5 Montreal, QC, Canada

Tel: 514-345-4713

Email: elie.haddad@umontreal.ca

ABSTRACT

One of the limitation of gene therapy is the non-specific expression of the transgene in all the lineages of the transduced stem cell, therefore, new specific promoters suitable for gene delivery are needed. This study aimed at developing a new methodology to design *in silico* synthetic promoters using short enhancer sequences, selected based on their annotation in Cap-analysis gene expression (CAGE) sequencing database. Based on this approach, we designed three promoters with predicted specificity for T cells, B cells and NK cells, and validated their cell specificity using a GFP reporter gene; both *in vitro* and *in vivo* using humanized mice. For the T-cell specific promoter – that we named “Promoter Inducing Restrained Activity to T-cell Expression” (PIRATE), we characterized the level and temporality of transgene expression during T-cell differentiation. We observed a very early activation during the T-cell development process. As a demonstration of a putative therapeutic use of such a promoter in a gene therapy setting, we tested the use of PIRATE to drive the expression of a chimeric antigen receptor (CAR) in a construction transduced in hematopoietic stem cells. We demonstrated a correct development of T cells expressing the CAR both *in vitro* and *in vivo*, and the specificity of expression was limited to the T-cell compartment. Taken together those results bring a proof of concept of the possibility to use CAGE-determined enhancers to build promoters tailored for specific and targeted expression for gene therapy.

Abstract word count: 237 words

INTRODUCTION

Gene therapy has become a reliable therapeutic strategy, as highlighted by the various clinical trials protocols and commercial treatments now available (1, 2). Hematopoietic stem cells (HSC) are the archetype of gene therapy because of their easy access, the technical know-how to manipulate them, and ease of engraftment, combined with the possibility to engineer them *ex vivo* (3). Actual gene therapy protocols rely on viral vector to insert a cassette coding for the gene of interest, which expression is under the control of a strong ubiquitous promoter (1). In inborn errors of the immune and hematopoietic system, such an approach has led to major advances using modified HSC to correct the nonfunctional gene (1, 4-6).

However, there are situations where the use of a strong ubiquitous promoter to drive the expression of the gene is not feasible or doesn't bring clinical benefits. It has been shown that the γ -type specificity is a prerequisite in many diseases and, therefore, a precise control of the transgene expression is required (7). For example, CD40L ubiquitous overexpression in hematopoietic cells has been shown to induce T-cell lymphoproliferative syndrome as the result of transgene genotoxicity when expressed in the T-cell compartment (8). Similarly, because of the need of the gene expression only in T cells (9), gene therapy for UNC13D deficiencies are currently envisioning an *ex vivo* correction of T cell, which would be a transient solution, instead of a durable corrected-HSC engraftment (10). These observations suggest that a controlled gene expression regulation is needed to enlarge the clinical indications of gene therapy (11, 12).

In addition, strong promoters have several drawbacks. If they assure good amount of expression, they do not retain the correct physiologic expression pattern both regarding cell type and levels of expression. Using viral vectors that insert randomly the transgene, strong promoters can activate overexpression of nearby oncogene and lead to cancer formation (13). The stability of expression is also a major issue, transgene tend to be methylated or generate cellular stress that ends in survival disadvantage of the modified cells (14). In a larger view, expression of supraphysiological amount of a protein can lead to immune reaction, generally caused by the expression, and thus presentation, by antigen-presenting cells (APCs) (15).

Another clinical application of gene therapy is CAR-therapy, which is usually used in T cells. Recently, chimeric antigen receptor (CAR) therapy has been shown to be efficient against cancer when the chimeric receptor is inserted in HSC (16). However, murine model of CAR HSC has

shown an impairment in T-cell development, probably induced by the tonic signaling triggered by the CAR expression during differentiation (17). In this context, genotoxicity is likely resulting from the overexpression, indeed the tonic signaling has been shown to be related to high expression level of the chimeric receptor. Lower or physiologic levels of expression has been shown to decrease this tonic signaling (18), hence the choice of promoter can be paramount in the success of this therapeutic strategy.

Altogether, generation of specific promoter and fine-tuning of the transgene are key steps to push gene therapy into a broader range of use. The field of gene therapy would benefit from an easy tool to design specific promoter suitable for lentiviral delivery, to enlarge the possibilities of clinical use. Regarding this problematic, our aim was to design new promoter sequences, that are small in size, and to validate them for their specificity.

Recent genomic data gave us the opportunity to detect more precisely the genetic activity across the genome. The FANTOM5 database was built to detect activation of transcription based on CAGE peaks in a cell-specific manner (19). The sequences mapped using this method suggested that a given enhancer is active in a cell type, and, therefore, could be used as a tool to detect potential sequence that could be inserted in retro or lentiviral constructs to adapt transgene expression to the desired population during gene therapy. By using Cap-analysis gene expression (CAGE) determined enhancers, we aimed to develop a collection of new promoters with specific activity in hematopoietic cell types as a new tool for gene therapy approach. As a proof of principle, we focused our strategy on a T-cell specific sequence, that we named “Promoter Inducing Restrained Activity to T-cell Expression” (PIRATE), and tested the efficiency of this strategy in vitro and in vivo.

RESULTS

In silico selection of enhancer sequences and generation of specific promoters

Specific promoter compatible with lentiviral production need to be short (20). To do so, we built de novo promoters based on the CMV minimal promoter sequence that doesn't allow the expression of transgene by itself, and upstream of this minimal promoter, we cloned short enhancer sequences that will increase expression level in a cell-type specific manner.

Enhancer sequences were selected based on CAGE Tag detection in the FANTOM5 database (19) to activate transcription in specific cell subpopulation(s). Taking advantage of the characterization

of enhancers based on bidirectional transcription start sites around enhancer sequence, we used the Presto (21) software to apply specific constrain to enhancer selection.

The first sequence selected was a T cell specific sequence that we named “Promoter Inducing Restrained Activity to T-cell Expression” (PIRATE). The PIRATE enhancer sequence selected is located on chromosome 16 and is 445bp long. It is located in an intronic region of ZFPM1 gene (Fig1A). Interestingly, this sequence display 8 repeated motifs of 50 nucleotides (Table 1), and is not described in any regulation system. Data from CHIP-Seq show interaction of various transcription factors in the vicinity of this sequence, again underlying the regulatory potential of this sequence. By comparison, the CAGE peaks from the A2UCOE promoter, a portion of which is included in our control ubiquitous promoter, display a stronger transcriptional activity (Fig1B and 1E). Coherent with this observation, when the CAGE score specifically attributed to a cell subtype were compared, the PIRATE was significantly active in T cells (0,511 tags/million) (Fig. 1C) whereas A2UCOE was detected in every cell type at similar level of activity (Fig. 1D). To validate the T-cell specificity, the PIRATE synthetic promoter was subcloned in a GFP reporter plasmid to allow cell transfection and detection of promoter activity (Fig1E).

Likewise, B and NK-specific enhancer sequences have been selected (Table 1) and synthetic promoters were constructed using the minimal CMV as described above. The enhancer selected for NK cell specificity is located on chromosome 8 (q22.3), and is 407 bp long (Fig. S1A). This sequence was significantly active in NK cells, with a CAGE score of 31.336 tags/million, but also in basophil (2.013 tags/million), and in T cells (1.503 tags/million) (Fig.S1 C). Finally, the selected B cell is located on chromosome 1 (q41), within the RAB3GAP2 gene, and is 303 bp long (Fig.S1 B). This sequence had a CAGE score of 5.108 tags/million in B cells, while the scores in other primary blood cell types were negligible (Fig.S1 D).

In vitro validation of PIRATE

To test the specificity of PIRATE sequence, we first transfected K562 (myeloid) and Jurkat (T cell) cell lines with the PIRATE-GFP reporter plasmid, pMAX-CMV-GFP or no DNA as positive and negative controls, respectively. While the pMAX-CMV-GFP induced the expression of GFP in both cell subtypes, the PIRATE-GFP reporter induced GFP expression only in the Jurkat T-cell line (Fig. 2A). Percentage of GFP+ cells (Fig. 2B), their absolute number (Fig. 2C) and the level of GFP expression (Fig. 2D) was higher in the T cell line compared to the myeloid cell line (K562).

To validate this observation in primary cells, we transfected PBMC with the same reporter constructs, and observed that PIRATE-GFP plasmid induced a high level of GFP expression in the T-cell compartment but no expression in monocytes and a reduced expression in B cells (Fig. 2 E&F). In contrast, pMAX-CMV-GFP transfection of PBMC resulted in GFP expression in all cell subtypes (Fig. 2 E&F).

To further characterize the pattern of expression of the PIRATE synthetic promoter, we generated lentiviral vectors containing the PIRATE-GFP cassette and transduced CD34⁺ hematopoietic stem cells (HSC). We induced CD34⁺ HSC differentiation using the OP9 or OP9-DL4 monolayer culture system to engage either B- or T-cell differentiation, respectively (22, 23). Cells harvested throughout the differentiation process expressed GFP only in the OP9-DL4 culture system (T-cell system), and in all the T-cell lineage differentiation steps (Fig. 3A-D). B cells obtained from the same PIRATE-GFP-transduced HSC on OP9 cells co-culture system did not express the reporter GFP under the control of the PIRATE, whereas GFP was expressed in all harvested cells from both culture system when the UCOE SFFV-GFP, ubiquitous promoter was used (Fig3E).

Characterization of PIRATE

To characterize this new promoter, we aimed to assess at which stage of development this sequence becomes activated. Using the OP9-DL4 differentiation system, we observed that GFP activity was detected as soon as the CD34⁺CD7⁺ pro-T stage (Fig3A). Those results suggest that activation of PIRATE sequence is an early event in the differentiation process (Fig3A). GFP expression was maintained in all steps of T cell development until single positive T-cell stage (Fig3B and D), showing that the differentiation process does not alter the pattern of PIRATE.

An important parameter is the transgene expression level induced by the PIRATE promoter. We compared the level of GFP signal by flow cytometry. Based on MFI measurement, we observed a lower expression of GFP when its expression was under the control of the PIRATE synthetic promoter compared to a ubiquitous strong UCOE SFFV promoter. This result was observed both in vitro in cell lines (Fig. 2D), PBMC primary cells (Fig. 2E) and OP9 differentiation (Fig. 3C and D).

In vitro validation of B and NK cells specific synthetic promoter

Similarly, the cell specificity of the in silico selected NK-specific sequence was tested in an IL-15 containing OP9 co-culture system (24) using HSC transduced or not with the NKenh-GFP reporter cassette. GFP expression was observed in NK cells, but not in B cells, in NKenh-GFP transduced cells (FIG. S2A) while GFP was expressed in both NK and B cells when transduced with a strong unspecific promoter (SFFV). For the B-cell enhancer, specificity was evaluated using a B-cell line (Nalm6) transfected with plasmid coding for the Benh-GFP cassette. The B cell-specific synthetic promoter was shown to induce the expression of the GFP only in B cells (FIG. S2B) suggesting that this promoter can induce the expression of a protein of interest in a B cell-specific manner.

In vivo validation

To validate in vivo the pattern of expression induced by the PIRATE, we transduced cord-blood CD34⁺ HSC with the GFP under the control of PIRATE or a strong promoter and humanized NSG mice. In this humanized mouse model, T cells appear approximately 8 weeks after HSC injection, and GFP⁺hCD3⁺ cells were observed in both conditions, when GFP was under the control of PIRATE or of a strong ubiquitous SFFV promoter (Fig. 4A), albeit at lower level of expression in condition where PIRATE drives the transgene expression (Fig. 4B). In contrast, GFP⁺B cells (hCD19⁺, Fig. 4C) and monocytes (hCD14⁺, Fig. 4E) were found only in mice where the GFP was controlled by the ubiquitous SFFV promoter, and at expression levels similar to T cells (Fig. 4 D & F). Altogether, we observed that GFP was detected only in T cells and not in the other lineages, validating the in vitro data (Fig. 4). The expression level of GFP was also reduced in comparison to control strong promoter validating the in vitro observations (Fig. 4B and 5B). We next used the BLT model, in which an autologous thymus is co-engrafted with the engineered HSC, in order to assess in vivo the impact of thymus differentiation on modified cells. The same pattern of expression that of huNSG mice was observed, with only T cells expressing GFP when under the control of PIRATE (Fig. 5A, C and E), but at lower levels of expression (Fig. 5B). In contrast, the strong ubiquitous SFFV promoter induced a strong GFP expression in T, B and monocytes (Fig. 5B, D and F). This result suggests that the transduction and the presence of additional copies of PIRATE enhancer sequence didn't impair thymic selection and development and allowed the expected expression of the GFP gene under the control of the PIRATE. Conversely, it also shows that thymic selection does not eliminate transduced cells.

Similarly, we tested the specificity of our in silico designed NK and B specific promoters in huNSG mice. Immune cells harvested from those mice displayed the expected restricted GFP expression in either NK (Fig. S3A) or B cells (Fig. S3B), demonstrating that this strategy of synthetic promoter design can be applied to other lineages as well.

PIRATE can drive the expression of a CAR in HSC-derived T cells and allow development of CAR-T cell in vivo

To assess the use of PIRATE for a clinical relevant use, we used this synthetic promoter to transduce a CAR in HSC and assessed CAR expression specificity . To achieve this, we replaced the GFP transgene by a second generation CAR targeting CD22.

We tested the T-cell differentiation from CAR-engineered HSC in vitro with the OP9/OP9-DL4 system, using a strong ubiquitous promoter (UCOE SFFV) or the PIRATE. In both situations, engineered HSC allowed the development of CAR bearing CD3+ cells, with the PIRATE condition resulting in specific expression only in T cells (Fig. 6A). In the UCOE SFFV condition, we observed that the proportion of cells expressing CAR under the control of the strong promoter decreased after 3 weeks of differentiation culture (Fig6B and C, blue curves). In contrast, this effect was not observed in the PIRATE controlled CAR group. This result suggests a possible disadvantage during development of high expression of CAR molecules. It has been reported by Albert et al. that tonic signaling induced by CAR can impair T cell development. Since tonic signaling is observed when CAR expression is very high (18), we measured CAR expression levels by assessing MFI of CAR staining and observed a decrease of MFI in the same dynamic as the drop in the proportion of CAR expressing cells (Fig. 6D and E), showing a reduction of the CAR expression level.

When we engrafted those CAR-engineered HSC in BLT mice, we observed the establishment of a CAR- expressing T-cell population whereas other immune subpopulations did not express the transgene, showing that PIRATE drives CAR expression without genotoxicity or immunogenicity (Fig. 6F). This also suggests that CAR expression at the surface of the cell during thymic differentiation does not lead to the deletion of T-cells, and that engineered HSC can reconstitute an immune system similar to non-engineered HSC.

Since the levels of expression induced by PIRATE are inferior to classic strong ubiquitous promoter, we tested whether this level of expression was sufficient for an efficient function of the CAR molecule to induce cytotoxicity. We transduced primary T cells with a CAR construct downstream either the UCOE SFFV strong promoter or the PIRATE sequence. As expected, CAR expression levels were higher in T cells transduced with the strong promoter than in the ones transduced with the PIRATE construct (Fig. 7A). Despite this difference in the level of expression, we didn't observe any significant difference in the lysis of target B-ALL (Fig. 7B, $p=0,9994$, Two-way ANOVA, Tukey post-hoc test), suggesting that the lower level of expression driven by our specific promoter was sufficient for CAR signaling and T-cell activation. To prove that this observation was not linked to the CAR construct itself, we tested CD33- and GD2-targeting CAR and showed that T-cells transduced with a PIRATE promoter exhibited an increased cytotoxic activity as compared with T cells non transduced (Fig. S4A and B, $p<0,0001$, Two-way ANOVA, Tukey post-hoc test).

DISCUSSION

Herein we describe a new method to design cell-specific synthetic promoters using open-access databases. We were able to demonstrate that this method is versatile as we could design 3 different promoters. The FANTOM5 database has annotation of theoretical enhancers for more than 200 cell types (21). The possibility to use such data to generate promoters suitable for gene therapy could be a major tool in a large number of clinical gene therapy settings, possibly applicable to other cells than the immune system. By a simple cloning of genomic enhancer sequence upstream of a minimal promoter we were able to generate three different synthetic promoters that retain specificity for different hematopoietic populations (T-cells, B-cells and NK cells). We based our promoter on the minimal CMV promoter, which is largely characterized (25), but since the specificity of the newly generated promoters lies in the selected enhancer sequences, one can suppose that various eukaryotic or synthetic minimal promoter could also be used. The CAGE score obtained during in silico sequence selection could be indicative of the expression levels the resulting promoter could induce. Indeed, the PIRATE enhancer had a CAGE score lower than a control ubiquitous strong promoter enhancer. This observation can suggest that a transgene expression induced by the

PIRATE would be lower than the control promoter, which was validated experimentally. This is also an indication of the possible use of CAGE score to predict the expression level induced by enhancers if this observation can be repeated with other enhancers.

The specificity of newly generated promoters was tested in vitro and showed the expected pattern of expression in regard of what was theoretically predicted. Some residual expression was detected in other populations, but could be attributed to the background signal observed during the transfection protocol. In vitro validation of the expression pattern of a promoter does not replicate fully the physiological situation; hence we chose to validate the specificity of the promoters in humanized mice model. The three promoters showed the expected pattern of expression in vivo, validating their specificity. Since the BLT model display a more physiologic development of the T cells within an autologous thymus, we validated the PIRATE using this model and showed no alteration of the specificity. This in vivo testing showed no intrinsic genotoxicity or immunogenicity of the promoter sequences by the correct development of all populations.

To use a new promoter in a clinical setting of gene therapy, it needs to be precisely characterized. Focusing on the PIRATE sequence, we aimed to confirm the enhancer behavior of our sequence. We have switched the orientation of the enhancer in the PIRATE sequence and observed that the promoter retain its activity specific to T cells showing a non-oriented enhancer activity, proving the flexibility of our strategy to clone new promoters (data not shown). Future directions would be the test of promoter that combine different CAGE-enhancer either to express transgene in different population, or to enhance the expression level by using multiple copy of the same specific enhancer. We then assessed the developmental steps of T cells to understand at which stage of the differentiation the PIRATE is activated. We showed that the reporter is active as soon as the pro-T stage, and that it is maintained during all the steps until the CD3 positive stage. Taken together, with the transfection in PBMC and the in vivo results observed in BLT model, we conclude that PIRATE induced a transgene expression that is maintained from the pro-T stage up to the fully mature T cell.

The level of expression is also a critical point in gene therapy (26). We assessed the expression level after transfection or transduction during differentiation or in vivo and showed a lower level

of expression of the GFP reporter compared to the control classic UCOE SFFV promoter, an observation that was consistent across in all experiments. This level of expression was not modified by the stage of T cells differentiation as we observed a stable and constant expression throughout the T cells differentiation process.

Recently, CAR therapy has been approved as the first commercial gene therapy for cancer. Hypothesis has been advanced toward the potential use of HSC to overcome the actual limitations of CAR-T cells such as exhaustion or therapeutic cells disappearance (27). Despite the proof of efficacy of a CAR-HSC strategy using huNSG (16), other studies have highlighted potential issue of development into T cells of HSC expressing an immune active transgene at their surface in a context of mouse HSC engrafted in mouse (17, 28). Restraining the activity of the promoter to the T cell subset may limit the impact of CAR expression on development. Antigen presenting cells (APC) do not express the CAR protein, which has already been reported to be a potential hurdle in gene therapy by generating immunogenicity against the transgene (15). It can be an explanation for the correct development of CAR T cells in our settings. Indeed, since APC don't express the transgene they are not able to present it either in the periphery or in thymic development. As shown by Eyquem et al. (18) the level of expression of the CAR transgene is also a critical point for tonic signaling. Interestingly our PIRATE promoter showed a lower, yet sufficient, level of expression of the CAR. This level can be associated with a reduced tonic signaling and so may be an explanation for overcoming developmental failure due to genotoxicity shown in previous publication from Albert et al. (17). Despite the lower expression level, the cytotoxicity triggered by the CAR remain as efficient as a strong promoter-driven CAR. This observation is again a demonstration of the importance of promoter regulation for gene therapy even in an artificial expression setting as the CAR therapy.

In a therapeutically relevant context, we demonstrated a use of the new PIRATE promoter in overcoming the limitation of the genotoxicity of CAR overexpression. Despite a proof of concept of the function of CAR HSC using a strong promoter, we hypothesize that the context of immunodeficient mice and classic humanization does not bring the complete model for genotoxicity and immunogenicity of CAR expression. By using the BLT model we demonstrate in more relevant model that the CAR HSC strategy seems to benefit from the use of the PIRATE.

In conclusion, this study brings proof of principle for generation of specific promoters in a versatile way for genetic modification in a therapeutic approach using CAGE-determined enhancers. Construction remain simple to use for generation of viral vectors and can be easily modified to adapt to treat a large diversity of diseases. We bring characterization of a new T-cell specific promoter, the PIRATE, and a proof of concept using this promoter to drive a relevant transgene, a CAR, for gene therapy of resistant cancer.

MATERIALS AND METHODS

In silico methodology for enhancer selection

Using Presto tool (19) and the FANTOM5 database (21), we selected regulatory elements no longer than 1,000bp and with specific activity detected only in desired cells as T, B or NK. To cut off from background of CAGE tags, we considered less than 0,150 tags per millions was an acceptable background signal and included sequences having less than that amount of tags in non-selected population. On the opposite, we considered over 0,300 tags per million a real positive signal and included only sequences having more than this cut off for T, B or NK. ChIP-Seq data was then assessed using UCSC genome browser and the ENCODE dataset track.

Cell Lines
Jurkat, REH, K562, THP1 and OP9 cell lines were bought from ATCC and cultivated in recommended medium. OP9-DL4 cell line was generated by transduction of Delta-like Ligand 4 (DL4) using lentiviral transduction of the OP9 cell line and sorted based on DL4 expression.

Transfection

Cell lines were transfected using Lipofectamine 3000 (Life Technologies) following manufacturer guideline. PBMCs were transfected using Lonza nucleofector kit for monocytes in a 2b nucleofector (Lonza) using program Y-001 of the machine. Expression of the transfected plasmid was assessed 24 hours after by flow cytometry.

Primary cells

Primary cells and tissues were obtained from healthy donors, after written informed consent. Ethical approbation was granted by the CHU Sainte-Justine (protocol #2126). PBMCs were maintained in complete RPMI (cRPMI) composed by RPMI 1640 with 10% FBS, penicillin and streptomycin. Stem cells were purified based on CD34 expression using Miltenyi UltraPure kit (Miltenyi) following manufacturer guidelines.

OP9-Delta-ligand4 co-culture

OP9 in vitro differentiation of HSC was conducted as described before (22). Briefly, OP9 culture medium is composed of base medium alpha-MEM with 20% FBS (Hyclone), GlutaMax (Gibco), penicillin and streptomycin, to which was added IL-7 (25ng/mL), Flt3-L (50ng/mL) and ascorbate (800nM) just before use to make differentiation medium. Approximately 5,000 CD34+ were placed on OP9 or OP9-DL4 monolayer in a 12 well plate, in 500ul of differentiation medium and 500ul of fresh differentiation medium was added twice a week. The non-adherent fraction was resuspended and putted on new monolayer of feeder cells each week and a portion was used for cytometric analysis.

Viral production

Viral production has been described before (29). Briefly, 2.4 million of 293T cells were plated in a 10 cm petri dish and transfected with the combination of vector, packaging and envelope plasmids the next day. Media was changed for OptiMEM the day after transfection and viral supernatant was harvested 2 days after. Viral supernatant was concentrated by ultracentrifugation and viral titer was determined using 293T cells. Transduction of hematopoietic stem cell was made with Baboon-envelop (BaEV) pseudotyped particles (30) whereas primary T cells were transduced with VSV-G pseudotyped vectors. Vector plasmids were generated by modification of the pHRSIN vector previously described (29), by introducing the specific promoter either driving GFP reporter gene or anti-CD22/GD2/CD33 CAR transgenes. The CAR- CD22 is a kind gift from Dr. Orentas (National Cancer Institute).

Viral transduction

Plate coated with RetroNectin (Takara) were incubated with 200 ul of concentrated virus 4h at 37°C. HSC were added in 100ul of Stemspan (Stemcell) at the desired number with protamine sulfate (8ug/mL) rapamycin (5nM) and CIHR99021(3μM) and plate was spinned for 1h at 1,000G. 700ul of stemspan with the same compounds was added after centrifugation and cells were used 24 to 72h after.

In vivo experiments

NSG mice were engrafted with approximately 100,000 CD34+ from cord blood cells after sublethal irradiation (2Gy) and reconstitution was checked in peripheral blood using FACS staining. BLT model was described before. Briefly, 250,000 to 500,000 fetal liver CD34+ cells were used to

humanize mice and fetal thymus piece was inserted under the kidney capsula by surgery (31). *Flow Cytometry analysis*

PBMC were stained after transfection using hCD3-PE-Cy7 (clone SK7, Biolegend), hCD19-PE (clone HIB19, Biolegend), hCD14-APC-Cy7 (clone HCD14, Biolegend), and 7AAD (BD) and analysis was conducted using LSR CANTO (BD).

Cell harvested from OP9 and OP9-DL4 co-culture wells were split and stained either for hCD34-APC (clone 581, Biolegend), hCD7-PE or FITC (clone M-T701, Biolegend), hCD1a-BV421 (clone HI149, Biolegend), hCD45-PE-Cy7 (clone HI30, Biolegend), hCD19-APC-Cy7 (clone HIB19, Biolegend), DAPI (Biolegend) or hCD45-PE-Cy7 (clone HI30, Biolegend), hCD4-APC-Cy7 (clone RPA-T4, Biolegend), hCD8-APC (clone RPA-T8, BD), hCD3-PE or FITC (clone UCHT1, Biolegend), DAPI (Biolegend) and analysis was conducted using LSR FORTESSA (BD).

In vivo blood samples were treated with red blood cell lysis buffer and stained using mCD45-PerCP-Cy5.5 (clone 30-F11, Biolegend), hCD45-PE-Cy7 (clone HI30, Biolegend), hCD3-APC (clone UCHT1, Biolegend), hCD19-BV421 (clone HIB-19, Biolegend), hCD14-APC-Cy7 (clone HCD14, Biolegend) and DAPI (Biolegend) and analysis was conducted using LSR FORTESSA (BD). CAR staining was performed using Siglec-2-Fc chimera (0,1ug/mL Novus biological) 30 minutes at 4°C then using goat anti-hFc-PE (Jackson immunoresearch)

REFERENCES

1. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Basile GdS, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, et al. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science*. 2000;288(5466):669-72.
2. Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, Yu Z-F, Tillman A, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017;390(10097):849-60.
3. Chabannon C, Kuball J, Bondanza A, Dazzi F, Pedrazzoli P, Toubert A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in its 60s: A platform for cellular therapies. *Sci Transl Med*. 2018;10(436):eaap9630.
4. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, Cassani B, Callegaro L, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(5):447-58.
5. Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A, Banerjee PP, Díez IA, Dewey RA, et al. Stem-Cell Gene Therapy for the Wiskott–Aldrich Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(20):1918-27.
6. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 2009;114(13):2619-22.
7. Kerns HM, Ryu BY, Stirling BV, Sather BD, Astrakhan A, Humblet-Baron S, et al. B cell-specific lentiviral gene therapy leads to sustained B-cell functional recovery in a murine model of X-linked agammaglobulinemia. *Blood*. 2010;115(11):2146-55.
8. Brown MP, Topham DJ, Sangster MY, Zhao J, Flynn KJ, Surman SL, et al. Thymic lymphoproliferative disease after successful correction of CD40 ligand deficiency by gene transfer in mice. *Nature Medicine*. 1998;4(11):1253-60.
9. Rivière J, Soheili T, Verhoeyen E, Galy A, de Saint Basile G, Fischer A, et al. Stem Cell and T-Cell Gene Therapy Using SIN-Lentiviral Vector In Type 3 Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Blood*. 2013;122(21):4214-.
10. Dettmer V, Bloom K, Gross M, Weissert K, Aichele P, Ehl S, et al. Retroviral UNC13D Gene Transfer Restores Cytotoxic Activity of T Cells Derived from Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Type 3 Patients In Vitro. *Hum Gene Ther*. 2019;30(8):975-84.

11. Booth C, Carmo M, Gaspar HB. Gene therapy for haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Curr Gene Ther.* 2014;14(6):437-46.
12. Hunter MJ, Zhao H, Tuschong LM, Bauer TR, Jr., Burkholder TH, Persons DA, et al. Gene therapy for canine leukocyte adhesion deficiency with lentiviral vectors using the murine stem cell virus and human phosphoglycerate kinase promoters. *Hum Gene Ther.* 2011;22(6):689-96.
13. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of Clinical Investigation.* 2008;118(9):3132-42.
14. Brooks AR, Harkins RN, Wang P, Qian HS, Liu P, Rubanyi GM. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *The Journal of Gene Medicine.* 2004;6(4):395-404.
15. Brown BD, Cantore A, Annoni A, Sergi LS, Lombardo A, Della Valle P, et al. A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood.* 2007;110(13):4144-52.
16. De Oliveira SN, Ryan C, Giannoni F, Hardee CL, Tremcinska I, Katebian B, et al. Modification of hematopoietic stem/progenitor cells with CD19-specific chimeric antigen receptors as a novel approach for cancer immunotherapy. *Hum Gene Ther.* 2013;24(10):824-39.
17. Albert S, Koristka S, Gerbaulet A, Cartellieri M, Arndt C, Feldmann A, et al. Tonic Signaling and Its Effects on Lymphopoiesis of CAR-Armed Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *The Journal of Immunology.* 2019;202(6):1735-46.
18. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJC, Hamieh M, Cunanan KM, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature.* 2017;543(7643):113-7.
19. Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, Hoof I, Bornholdt J, Boyd M, et al. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature.* 2014;507(7493):455-61.
20. Canté-Barrett K, Mendes RD, Smits WK, van Helsdingen-van Wijk YM, Pieters R, Meijerink JP. Lentiviral gene transfer into human and murine hematopoietic stem cells: size matters. *BMC research notes.* 2016;9:312.
21. Forrest ARR, Kawaji H, Rehli M, Kenneth Baillie J, de Hoon MJL, Haberle V, et al. A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature.* 2014;507(7493):462-70.
22. Mohtashami M, Shah DK, Kianizad K, Awong G, Zúñiga-Pflücker JC. Induction of T-cell development by Delta-like 4-expressing fibroblasts. *Int Immunol.* 2013;25(10):601-11.

23. Yu J, Choi S, Kim H, Lee N, Yun H, Kim S, et al. Generation of an osteoblast-based artificial niche that supports in vitro B lymphopoiesis. *Experimental & molecular medicine*. 2017;49(11):e400.
24. Lowe E, Truscott LC, De Oliveira SN. In Vitro Generation of Human NK Cells Expressing Chimeric Antigen Receptor Through Differentiation of Gene-Modified Hematopoietic Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2016;1441:241-51.
25. Ede C, Chen X, Lin M-Y, Chen YY. Quantitative Analyses of Core Promoters Enable Precise Engineering of Regulated Gene Expression in Mammalian Cells. *ACS Synth Biol*. 2016;5(5):395-404.
26. Miao CH, Ye X, Thompson AR. High-Level Factor VIII Gene Expression In Vivo Achieved by Nonviral Liver-Specific Gene Therapy Vectors. *Hum Gene Ther*. 2003;14(14):1297-305.
27. Gschwend E, De Oliveira S, Kohn DB. Hematopoietic stem cells for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 2014;257(1):237-49.
28. Lin WY, Roberts MR. Developmental dissociation of T cells from B, NK, and myeloid cells revealed by MHC class II-specific chimeric immune receptors bearing TCR-zeta or FcR-gamma chain signaling domains. *Blood*. 2002;100(8):3045-8.
29. Colamartino ABL, Lemieux W, Bifsha P, Nicoletti S, Chakravarti N, Sanz J, et al. Efficient and Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector. *Front Immunol*. 2019;10(2873).
30. Girard-Gagnepain A, Amirache F, Costa C, Lévy C, Frecha C, Fusil F, et al. Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood*. 2014;124(8):1221-31.
31. Melkus MW, Estes JD, Padgett-Thomas A, Gatlin J, Denton PW, Othieno FA, et al. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nature Medicine*. 2006;12(11):1316-22.

ACKNOWLEDGMENTS

A.C., P.B., C.C., W.L., C.T.L., S.N., M.G., H.R., S.S., M.G., A.B. and Y.L. performed the experiments. A.C. and K.B. wrote the manuscript. E.H. generated the hypotheses, conceptualized the study and wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript. This work

was supported by grants from the CCS-Quebec Division/Mont Gabriel Summit Research Fund (Cole Foundation) Grants #705471 and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) funding #388358. A.C. is supported by the Cole Foundation scholarship award.

2.1. Tableau

Table 1. Selected enhancers sequences used for the construction of cell-specific synthetic promoters

Cell Specificity	Genome localization	Sequence
T cell (PIRATE)	chr16:8853688-3-88537327	<p>CTGGTGGTGTGGAGGGCCGGGTGGTGACACTCAGTGACAGGTGAGGATGT</p> <p>GGCACGGTGTGGAGGGCCGGGTGGTGACGCTGAGTGACAGGTGAGGATGT</p> <p>GGCACGGTGTGGAGGGCCGGGTGGTGACGCTGAGTGACAGGTGAGGATGT</p> <p>GGCACGGTGTGGAGGGCCGGGTGGTGACGCTGAGTGACAGGTGAGGATGT</p> <p>GGCACGGTGTGGAGGGCCGGGTGGTGACGCTGAGTGACAGGTGAGGATGT</p> <p>GGCACGGTGTGGAGGGCCGGGTGGTGACGCTGAGTGACAGGTGAGGATGT</p> <p>GGCACGGTGTGGAGGGCCGGGTGGTGACGCTGAGTGACAGGTGAGGATGT</p> <p>GGCATAGGGAAACACATCCTCGCCGAGCGCACAGTGGGAGCTCCG</p>
B cell	chr1:220219915-220220218	<p>CTGACAAGATGCAAGCTCATCATTTTGTGTTTGTGTCATAAGGGCATTGCTA</p> <p>CTA</p> <p>CTA</p> <p>ATTAGCGTTTTGGAAACTTCCCCAATA</p> <p>ATGGGGCCACAGTCTCTAAC</p> <p>ACTGCCCCTTTGAAGCTAGTGATCCAAAAATAATATCATTTGACAAGGT</p> <p>AATT</p> <p>TCCCAAGCCACGCCGAAATGTAAACAAAAAAGCACCTCACTGCTTAA</p> <p>AGG</p>

		TGCTCCACCAGGGACCTTGGGTTTTCCACCAAACTTGCCTCCCCACCC TGTT
		ACTAAAGTTGACA CTGAATTTGCCTGCAGTCTCCCCCA
NK cell	chr8:10310 9879- 103110286	ATCAGAAGTTGCGTGGGTCATGAAGCCCAAGGCCAGCAGTTCTGGATGC CTCC ATGAAGCTGGATATTGCTTACTTGTTAGCATCCCTCTCTGGCAATCATCA ATAACC TCTTTTCAAAAGTACCTCCTTATACAAGACTCTTATCAACTGATTTTCATC ATTTTTA GCACTGAAACCTTGGTCTTCCTGCTCTCTGCTCTGACAGCATCTCTCTGA TAACCT GAGAAATCAGAGTTTCACCCCTGAACTAAACAGGCCATTATTTCTTAA TTTTAA ATGATGACATGACAAGCCTTCACCCTATCTGTTTCTTATTTCTTGA CTCCCA CCCTCACCAGCAGCCAAACACAAATCACAACGCAATGCAAAGGCCAGGC CACAGA ACACGCTGTGAATCGACAGTTTCAGAAGACGTCATTCACACAATGTGCA AGGCACT TCCTGCACAGCCATCTCTGTGCCCCTGCAAA GGGCATGTGGCATGAGGCAGTAAA ATAAGTATAGTCTGTGTTTGGGTATGAAAGGTGGTGGGTGGGGCGTGAA TACATCC AAGATATGCTTTAGGACTAAGTCAAAAGAGAACTGAGAGTGAGAAAGA AGATTG

* Underlined is the highly repeated motif

2.2. Figures

FIGURE CAPTION

Figure 1. *In silico* selection of “Promoter Inducing Restrained Activity to T-cell Expression” (PIRATE). Schematic representation of CAGE peaks from FANTOM5 database for the PIRATE enhancer locus (**A**) and ubiquitous A2UCOE promoter (**B**). **C-D.** Specific CAGE score (tags per million) detected for (**C**) PIRATE enhancer, and (**D**) A2UCOE region for principal hematopoietic population. **E.** Construction of synthetic promoter based on selected sequence in a GFP testing cassette.

Figure 2. *In vitro* validation of PIRATE specificity. (**A**) Representative dot plot of GFP signal upon lipofection with no DNA, PIRATE GFP construct or pMAX-CMV-GFP (pMAX) in which the GFP expression is driven by a CMV promoter in Jurkat (T cell line – left column) and K562 (myeloid cell line – right column). **B-C-D.** Quantification of GFP+ population upon transfection of Jurkat (left) and K562 (right) cell lines expressed as (**B**) the percentage of GFP+ cells among the overall population, (**C**) the absolute number of GFP+ cells, and (**D**) MFI levels measured on these GFP+ cells (shown are mean with SD, background level of negative control was subtracted in each case). (**E**) Representative dot plot of PBMC nucleofected with no DNA, PIRATE-GFP reporter construct or pMAX. (**F**) Quantification of the absolute cells number of GFP+ cells among nucleofected PBMCs when using the PIRATE-GFP or the pMAX-GFP reporter plasmids (shown are means).

Figure 3. PIRATE-induced transgene expression throughout T cell differentiation *in vitro*. Mean percentage of GFP-expressing cells among early (**A**) and late (**B**) stage of T cell development on OP9-DL4 differentiation system. PIRATE-GFP transduced or UCOE-SFFV-GFP (strong ubiquitous promoter) HSC co-cultured were monitored over time for GFP expression in

CD7⁺CD1a⁺CD34⁻, CD7⁺CD1a⁻ CD34⁻ or pro-T (CD34⁺CD7⁺CD1a⁻). Those same cells were discriminated on later stages of differentiation using CD4 and CD8 markers as double negatives (DN), single positives CD4⁺ or CD8⁺, or CD4 and CD8 double positives (DP). **C** and **D** show the mean GFP MFI signal of those positive cells for early and late stage populations, respectively, over time of culture. **E** Percentage of GFP positive B cells after 2 weeks of OP9 differentiation of HSC untransduced, transduced with PIRATE GFP or UCOE SFFV GFP constructs (Mean with SD).

Figure 4. *In vivo* validation of PIRATE specificity. NSG mice were engrafted with HSC either non-transduced, transduced with PIRATE-GFP or with UCOE-SFFV-GFP construct. Peripheral blood was collected and analyzed by flow cytometry to assess percentage of GFP expressing cells among **(A)** T cells (hCD3⁺), **(C)** B cells (hCD19⁺) and **(E)** monocytes (hCD14⁺) through time after humanization. Mean MFI values of the GFP⁺ cells are shown for PIRATE GFP and UCOE SFFV GFP groups in **(B)** T cells, **(D)** B cells and **(F)** monocytes through time after humanization. Mean +/- SEM are depicted.

Figure 5. *In vivo* validation of PIRATE specificity in context of thymic selection. NSG mice were humanised with HSC either non-transduced, transduced with PIRATE GFP or with UCOE SFFV GFP construct and co-engrafted with an autologous fetal thymus under the kidney capsula. Peripheral blood was collected and analyzed by flow cytometry to assess percentage of GFP expressing cells among **(A)** T cells, **(C)** B cells and **(E)** monocytes over time after humanization. MFI of the GFP are shown for PIRATE GFP and UCOE SFFV GFP groups in **(B)** T cells, **(D)** B cells and **(F)** monocytes over time after humanization

Figure 6. *In vitro* and *in vivo* differentiation of HSC transduced with PIRATE CAR construct. **A.** Percentage of CAR staining positive B cells after 2 weeks of OP9 differentiation of HSC or CD3 and CD4 positives cells after 5 weeks of differentiation in OP9-DL4 system untransduced, transduced with PIRATE CAR CD22 or with UCOE SFFV CAR CD22 constructs. Percentage of CAR expressing cells among early **(A)** and late **(B)** stage of T cell development on OP9-DL4 differentiation of HSC untransduced, transduced with PIRATE CAR CD22 or UCOE SFFV CAR CD22 over time of culture. **C** and **D** show the CAR staining MFI mean values of those positive

cells respectively for early and late stage populations over time of culture. **G.** BLT mice were reconstituted with HSC either non-transduced or transduced with the PIRATE CAR CD22 construct and peripheral blood sample is analyzed by flow cytometry for CAR expression on B or T cells.

Figure 7. Functional testing of T cell expressing a chimeric antigen receptor under the control of the PIRATE synthetic promoter. **A.** T cell expanded with Dynabeads (Gibco) were transduced with PIRATE CAR CD22, UCOE SFFV CAR CD22 construct or left untransduced and re-expanded for 7 days. CAR expression was assessed by flow cytometry. **B.** Cytotoxicity assay was conducted against RS4/11 B-ALL cell line and specific lysis was measured by flow cytometry after 24h co-culture. **C.**

Figure S1. NK and B specific selected enhancer sequences for synthetic promoter construction. Schematic representation of CAGE peaks obtained from the FANTOM5 database for **(A)** the NK cell specific sequence, and **(B)** the B cell specific sequence. **C-D.** Specific CAGE score (tags per million) detected for **(C)** NK-specific enhancer, and **(D)** B-cell specific enhancer region for principal hematopoietic population.

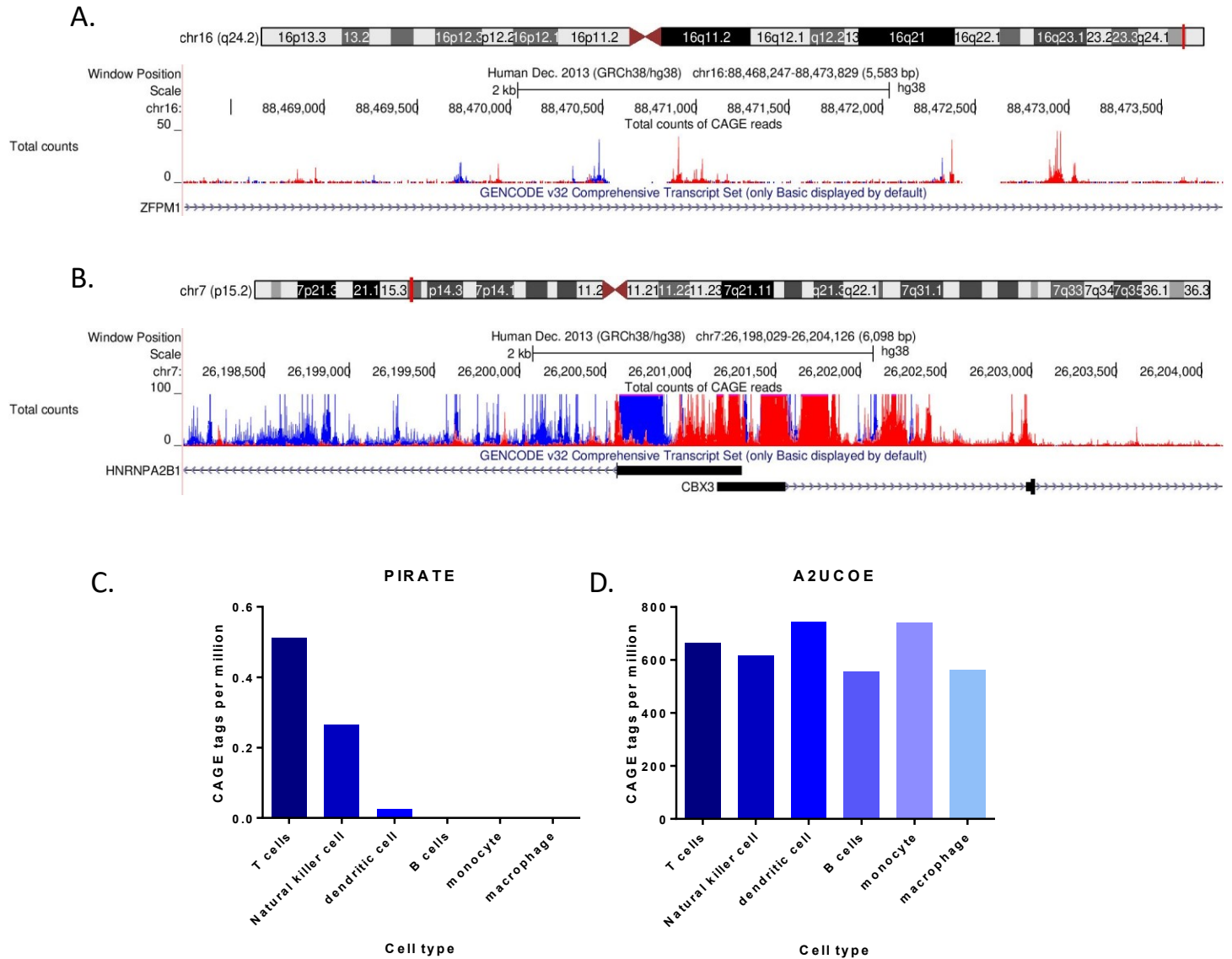
Figure S2. *In vitro* validation of NK and B cell specific synthetic promoter. **(A)** Percentage of GFP-expressing cells during NKenh-transduced HSC differentiation development on OP9/OP9-DL4 differentiation system. **(B)** Representative dot plot of GFP signal upon lipofection with Benh-GFP construct or pMAX in which the GFP expression is driven by a CMV promoter in Nalm6 (B cell line).

Figure S3. B and NK specific promoter *in vivo* validation. **A.** NSG SGM3 mice were engrafted with HSC transduced with NK-spe GFP construct and peripheral blood was collected and analyzed by flow cytometry to assess percentage of GFP expressing cells among B cells, T cells and NK cells. **B.** NSG mice were engrafted with HSC transduced with B-spe GFP construct and blood

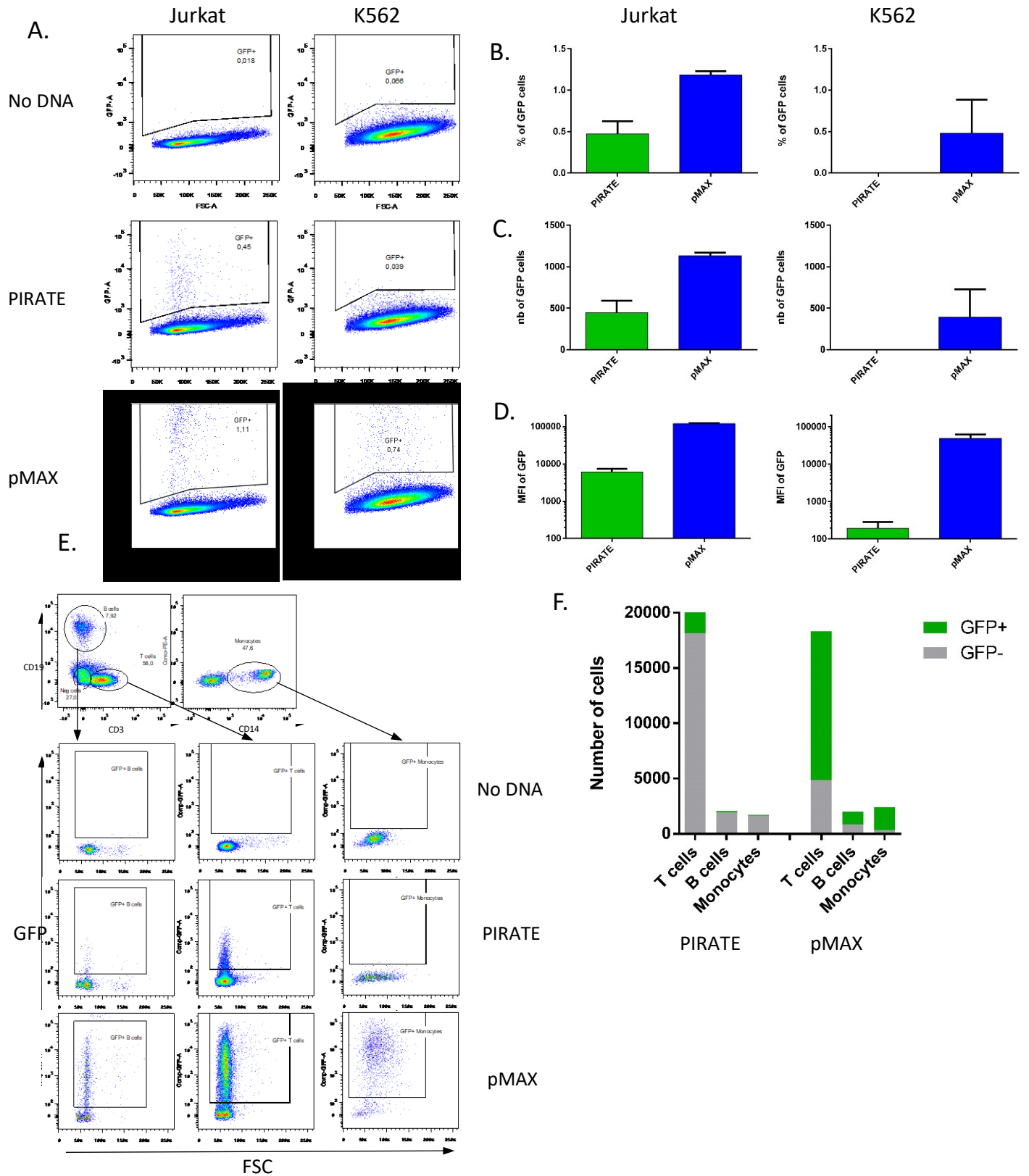
sample was assessed the same way to discriminate B cells and monocytes, no T cells was present at that time.

Figure S4. *In vitro* functional testing of primary T cell expressing a CAR anti-CD33 or anti-GD2 construct under the control of the PIRATE promoter. T cell expanded with Dynabeads (Gibco) were transduced with PIRATE CAR CD33, UCOE SFFV CAR CD33 construct or left untransduced and re-expanded for 7 days. Cytotoxicity assay was conducted against HL60 AML cell line and specific lysis was measured by flow cytometry after 24h co-culture for different effector to target ratio (**A**). Similarly, T cells expressing CAR anti-GD2 were tested against the GD2+ SK-N-DZ cell line (**B**).

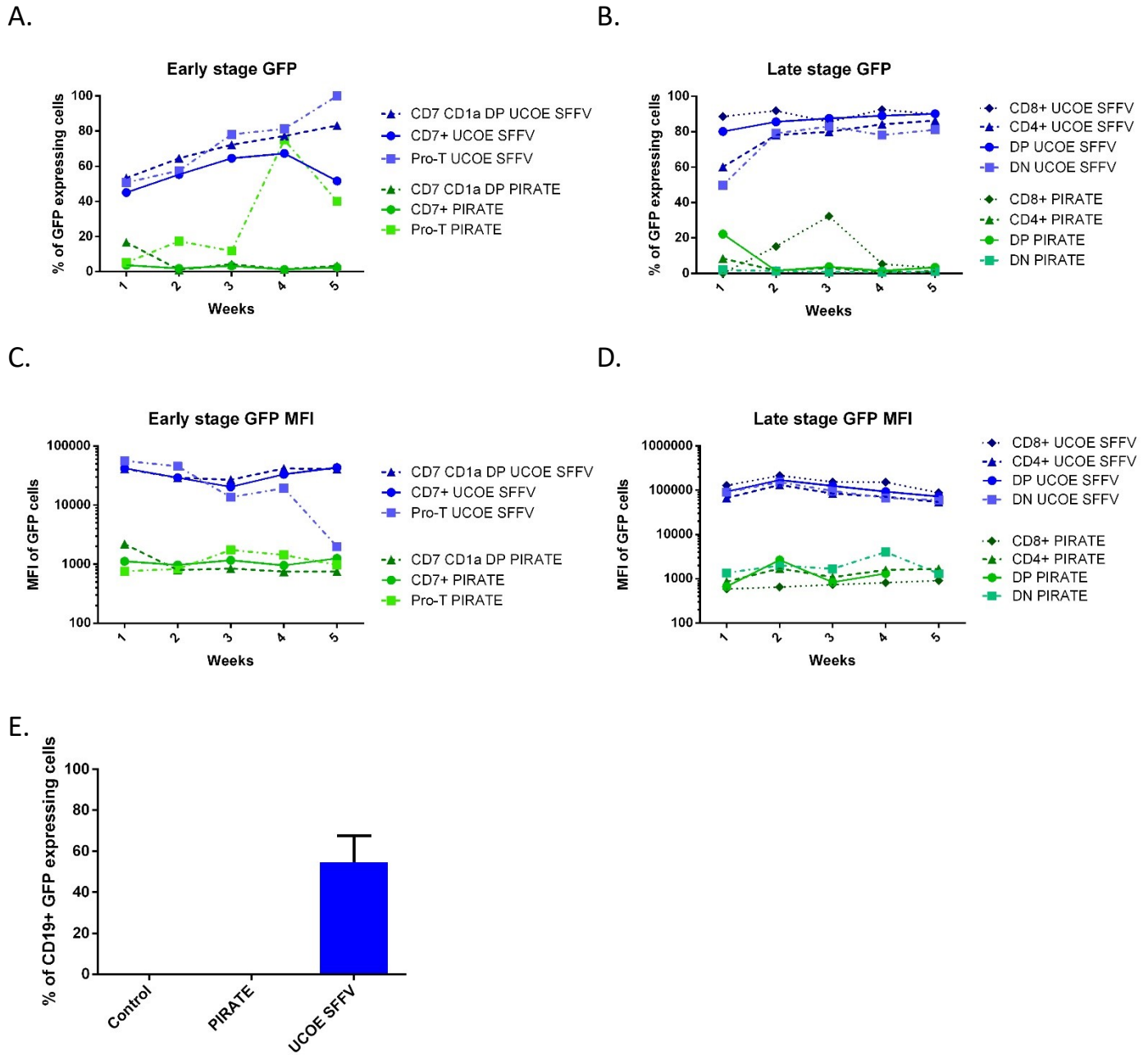
2.2.1. Figure 1



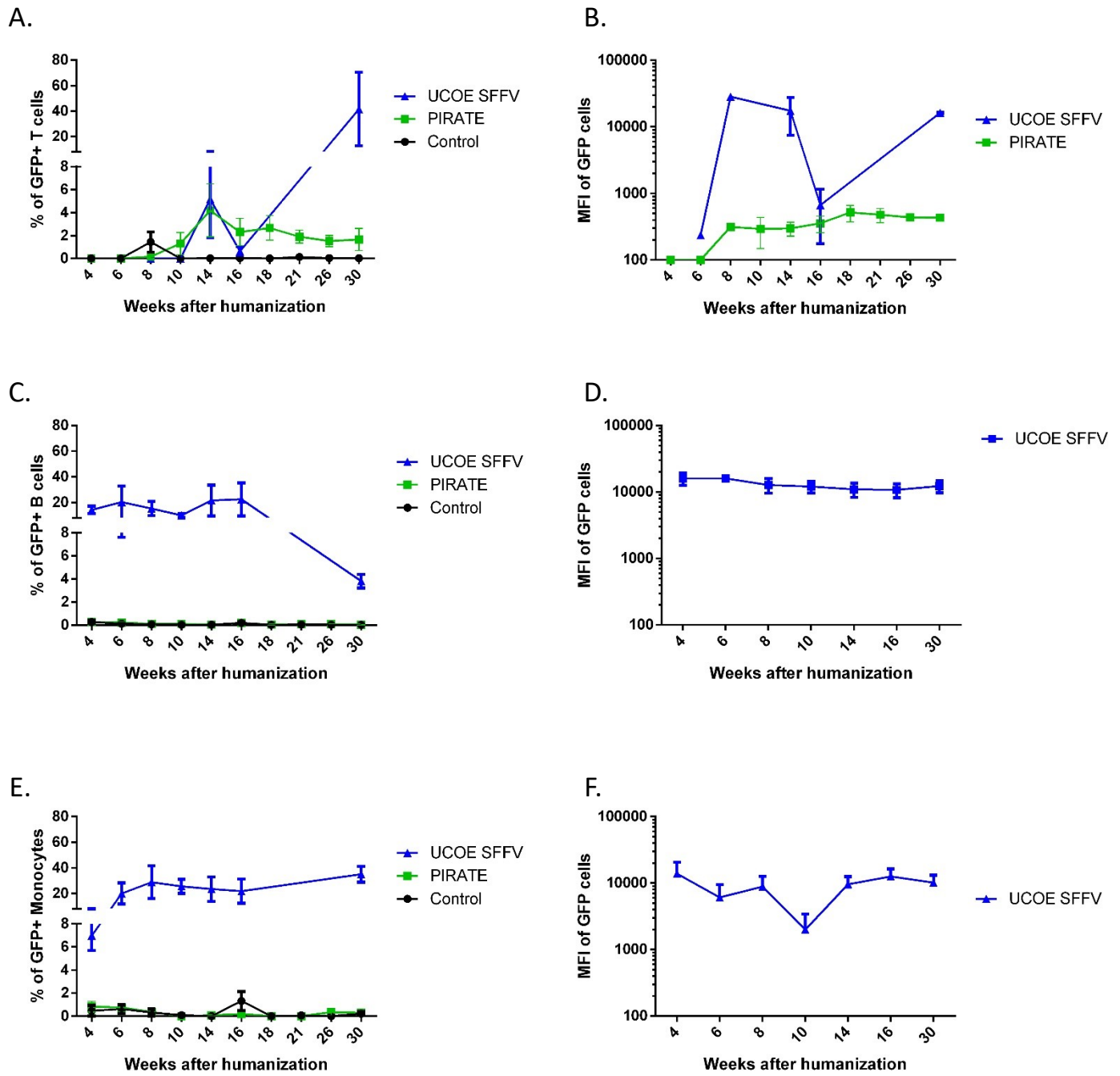
2.2.2. Figure 2



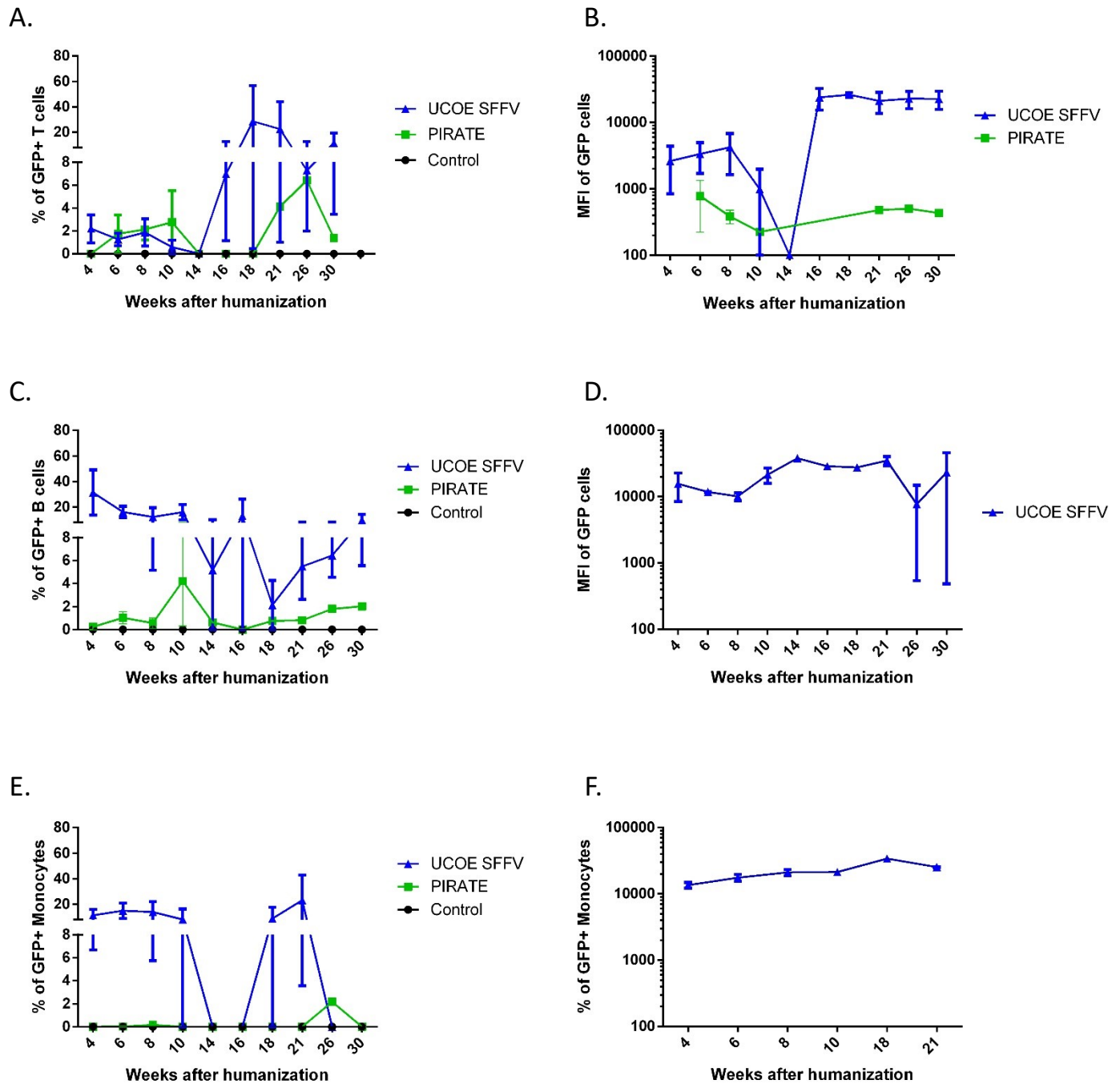
2.2.3. Figure 3



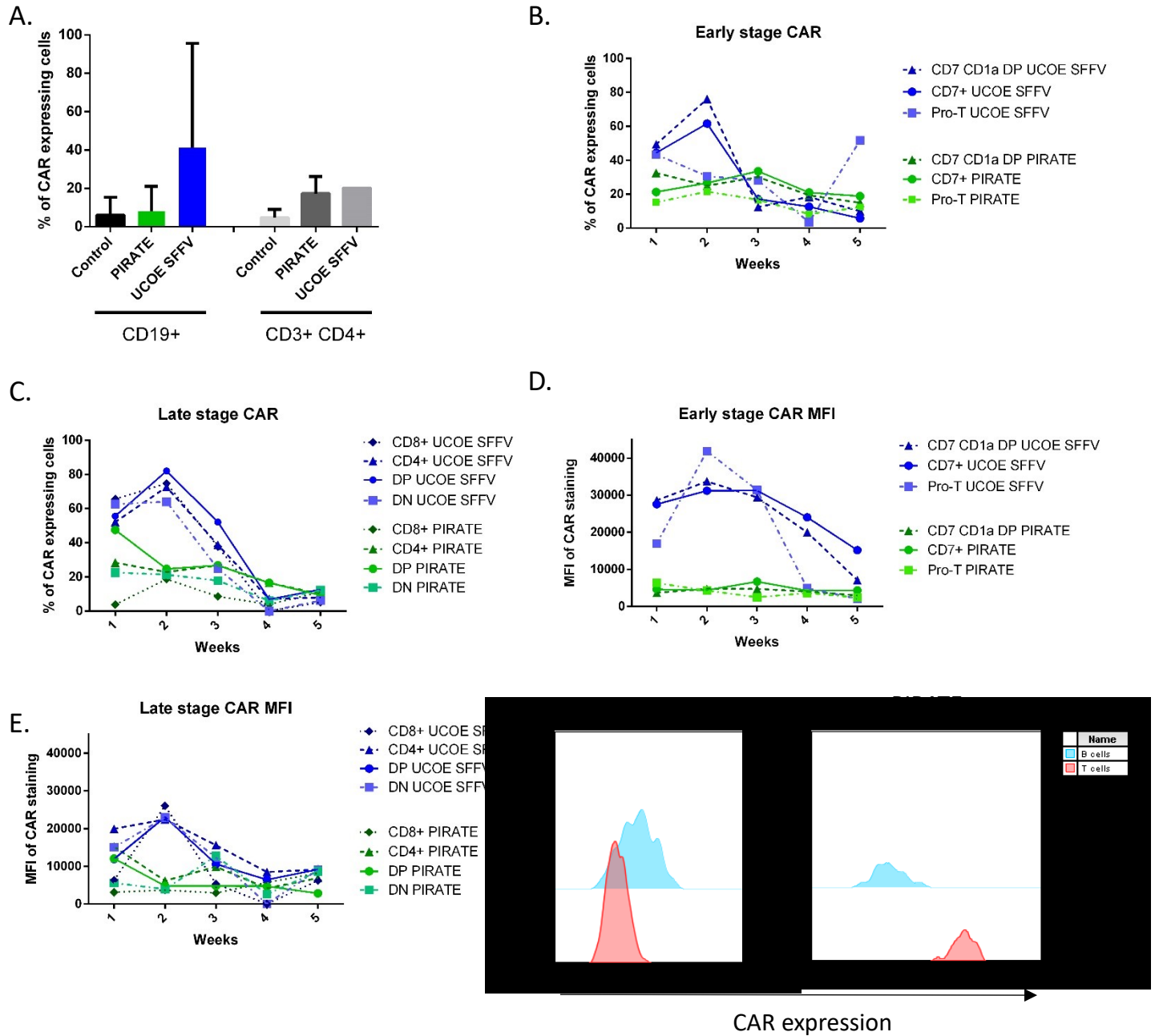
2.2.4. Figure 4



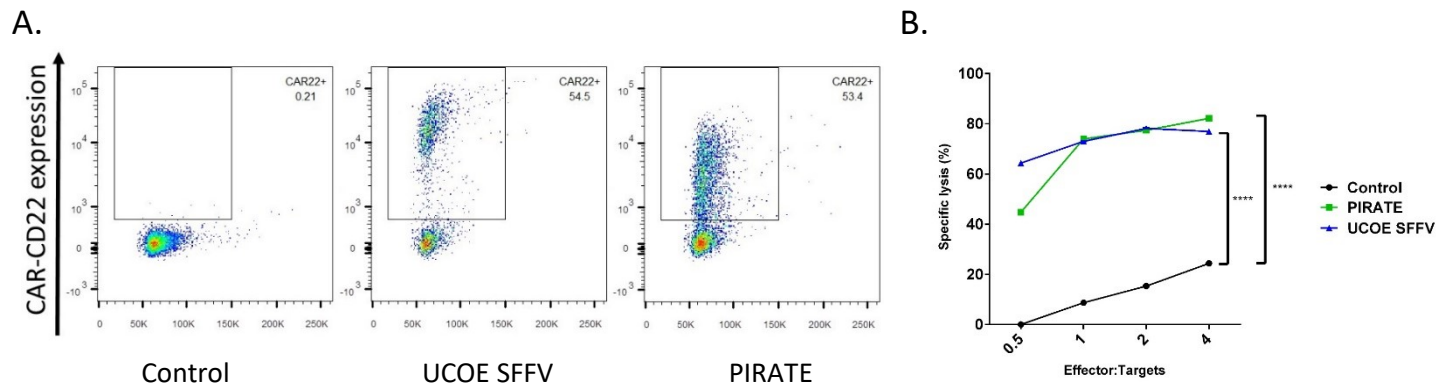
2.2.5. Figure 5



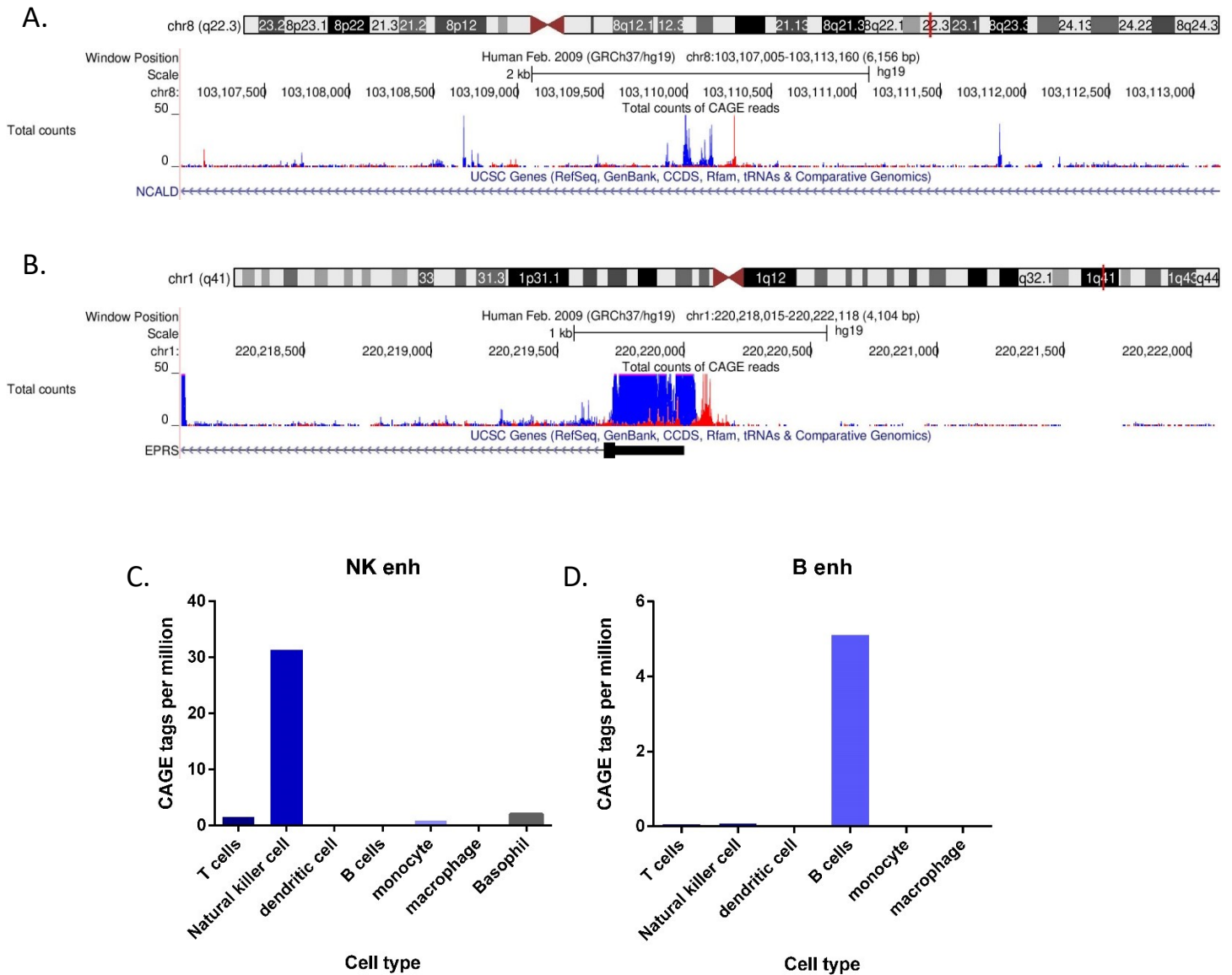
2.2.6. Figure 6



2.2.7. Figure 7

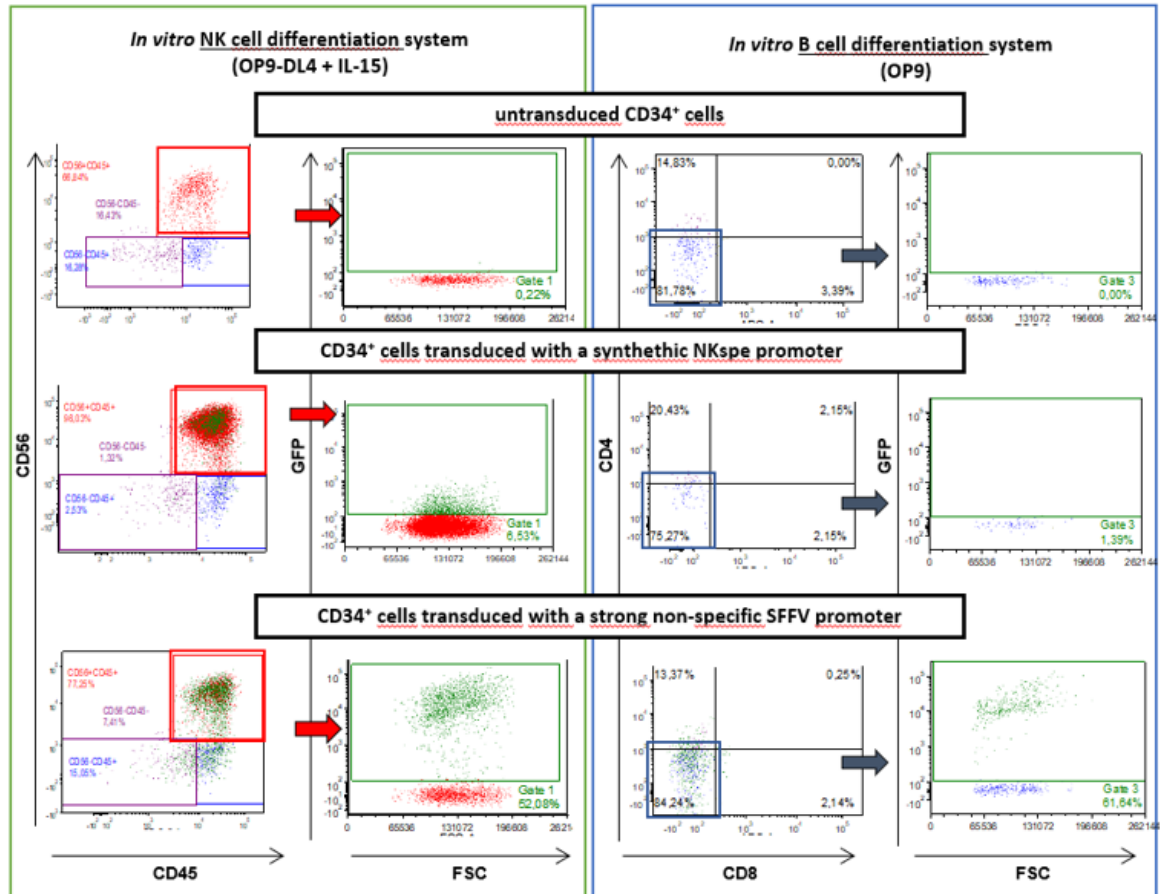


2.2.8. Figure S1

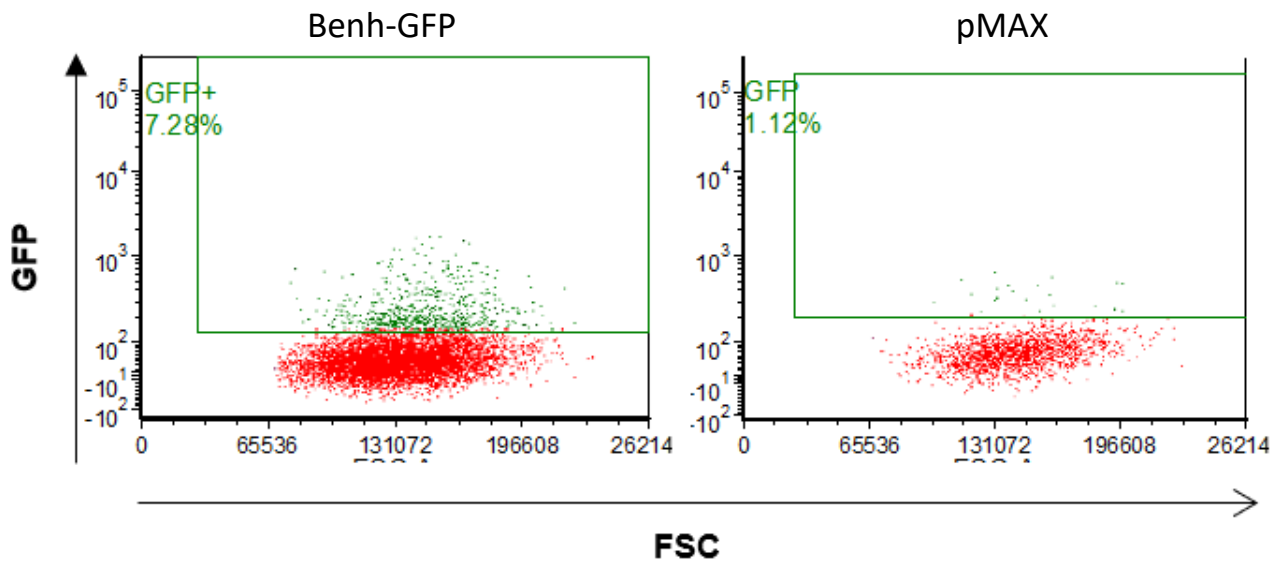


2.2.9. Figure S2

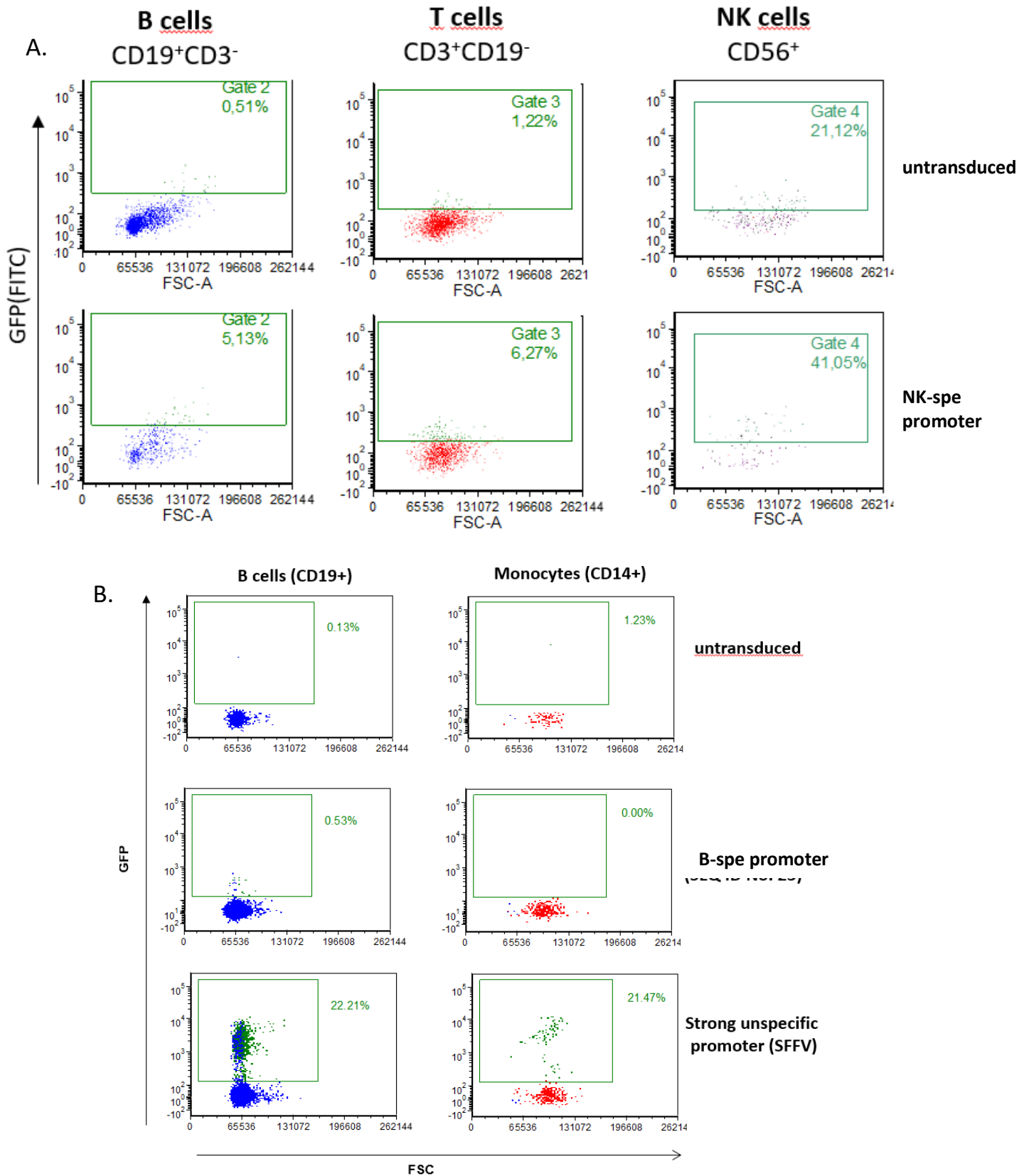
A.



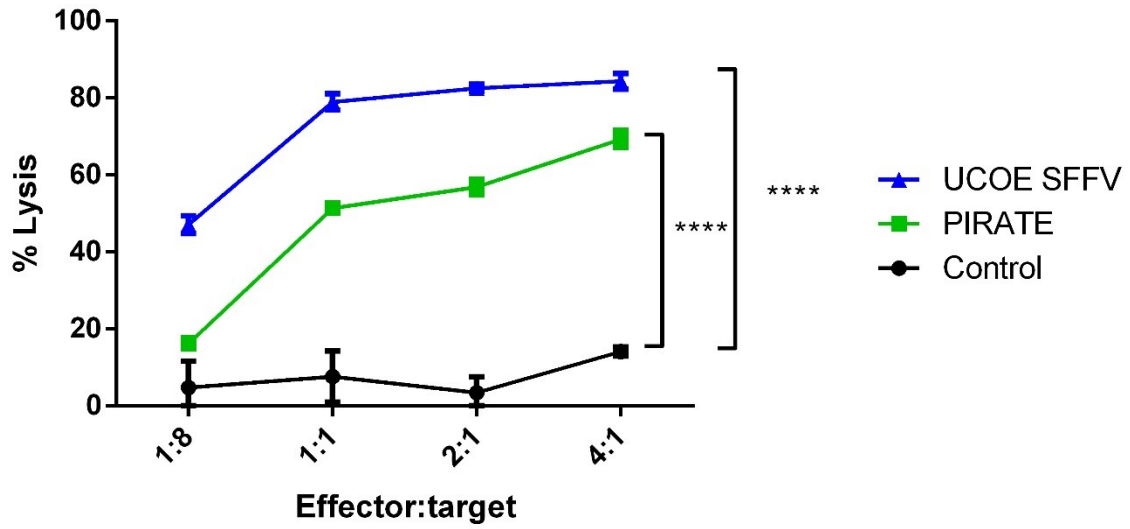
B.



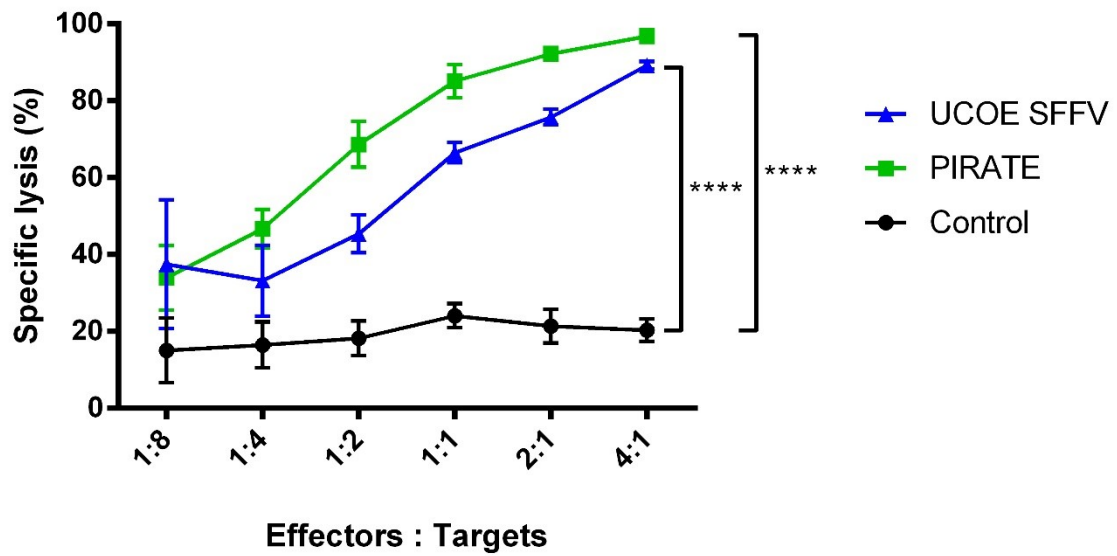
2.2.10. Figure S3



A. Cytotoxicity of CAR CD33 T cells



B. Cytotoxicity of GD2 CAR T cells



Chapitre 5 – Discussion et Perspectives

3. Analyse et implications des résultats

La problématique d'épuisement et de disparition des cellules T dans la thérapie CAR nous a poussé à tester d'autres approches d'immunothérapie par l'utilisation des cellules NK et des HSC. Les résultats présentés ici démontrent la possibilité d'utiliser ces types cellulaires dans cette optique. Ces types cellulaires ayant des dynamiques différentes ils pourraient permettre de dépasser les problèmes de la thérapie CAR utilisant les cellules T.

3.1. La transduction des NK et la thérapie CAR

3.1.1. L'impact d'une méthode de transduction efficace des NK

Jusqu'à maintenant la transduction des cellules NK restait un défi technologique qui empêchait une utilisation aussi efficace que les cellules T (404, 451, 452).

Actuellement de nombreux essais cliniques sont en cours en utilisant des CAR NK. Une grande partie utilise la lignée cellulaire NK92 pour la simplicité d'utilisation. Il est plus simple de transduire un clone cellulaire avec le CAR puis de la faire proliférer pour l'injecter. De nombreux désavantages viennent avec l'utilisation de cette lignée. Le premier étant bien sur l'interdiction de l'utiliser sans irradiation préalable, empêchant ainsi tout effet de prolifération d'une thérapie CAR. Le second problème est la capacité réduite des NK92 à tuer des cellules cibles en comparaison avec des NK primaire. De plus, les cellules NK92 ont une fonctionnalité accrue par rapport aux autres lignées NK à cause de certains défauts génétiques comme l'absence de KIR inhibiteurs, ce qui peut diriger leur toxicité vers des cellules saines (453). Nous espérons que l'amélioration de la méthode de transduction permettra de dépasser l'utilisation de cette lignée cellulaire pour se concentrer sur

des cellules NK primaires pour la thérapie CAR (454, 455). La technique de transduction présentée ainsi que la méthode d'expansion des NK utilisées permettent de produire un grand nombre de cellules thérapeutiques. Ces technologies devraient rendre plus facile la standardisation de production de cellules NK thérapeutiques en se passant de la lignée NK92.

Certains essais cliniques ont déjà utilisé des cellules NK amplifiées de la même manière que présenté ici (456). La réponse clinique bien que bénéfique n'a jamais été aussi claire que celle observée par les essais utilisant des cellules CAR T jusqu'à très récemment (415). Cependant les problèmes liés à la transduction des cellules NK n'ont pas permis de mettre en place le même nombre d'essais avec des NK exprimant un CAR dirigé contre CD19. Actuellement très peu d'essais cliniques ont pu être menés avec des cellules CAR NK notamment à cause de la problématique de transduction.

Les résultats présentés jusqu'ici démontrent la possibilité d'utiliser efficacement les cellules NK pour la thérapie CAR. Ces cellules sont capables de répondre au signal CAR et de lyser les cellules cibles en réponse à ce signal. Il est montré dans le Chapitre 2 que leur transduction peut-être aussi efficace que celle des cellules T et le système d'expansion NKAES utilisé a permis une expansion suffisante pour un traitement clinique potentiel, même en partant d'un faible nombre de cellules dans le cas du CAR double.

Il semble donc que les technologies actuelles comprenant les travaux présentés ici permettent de rattraper le retard d'utilisation des NK par rapport aux cellules T. Il reste un travail de fond pour rendre utilisable en clinique toutes ces méthodes, mais il semble que les verrous technologiques aient été levés.

Si l'optimisation de la technologie de transduction et de culture cellulaire est arrivée à maturation, il est possible que l'utilisation des CAR actuels ne soit pas optimale. Les CAR ont été conçus pour une activation optimale des cellules T. Si les portions externes ont une utilisation similaire, les segments internes n'auront peut-être pas un effet optimal en l'état.

3.1.2. Optimisation des CAR pour les NK

Il a bien été prouvé dans ce travail et dans d'autres études (414), que les CAR de seconde génération actuels fonctionnent. Cependant, les portions internes de CAR peuvent induire un épuisement cellulaire des cellules NK ou un signal sous-optimal. L'idée d'utiliser des segments activateurs de récepteurs NK typique est avancée depuis plusieurs années mais il faut encore de nombreux test pour déterminer quel signal est le plus optimal. L'une des perspectives du travail présenté ici est donc d'optimiser les constructions de CAR pour les cellules NK.

1.1.2.1 Utilisation de segments de récepteurs NK

Il est envisageable d'utiliser comme segment de signalisation pour des CAR NK des fragments de récepteurs activateurs typiques de ces cellules comme NKG2D ou les NCR. Les travaux de Li *et al.* ont testé un panel de nouveaux CAR pour améliorer l'efficacité dans les NK (457). Ces travaux montrent un effet bénéfique du segment de costimulation 2B4 lié avec la portion transmembranaire du NKG2D. L'amélioration significative du potentiel de lyse engendrée par ce CAR dans les NK montre que la composition actuelle des CAR peut être améliorée pour ce type cellulaire. Il est difficile de conclure quant à la véritable efficacité de ces nouvelles constructions en utilisant des cellules NK matures car l'étude de Li *et al.* utilise des NK dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Encore une fois les travaux présentés ici permettent de faciliter l'étude des CAR avec des NK matures en permettant une transduction efficace.

1.1.2.2. Utilisation de segments de récepteurs aux cytokines

De nouveaux segments utilisant les signaux des récepteurs aux cytokines sont à l'étude et ont démontré de bons résultats. Kagoya *et al.* ont intégré un fragment de la chaîne β du récepteur à l'IL-2 dans un CAR de seconde génération pour utiliser les signaux des voies JAK-STAT pour activer des cellules T. L'idée d'intégrer aux signaux envoyés par le CAR un signal mimant la

liaison de cytokine semble très bien fonctionner avec les cellules T (458) et ce principe pourrait être utilisé avec les cellules NK. Les signaux transmis par l'IL2 et l'IL-15 notamment par les voies JAK-STAT sont centraux dans la physiologie NK comme mentionné plus haut, il est donc logique de tester ce type de stratégies pour ces cellules.

Les NK utilisent le second messenger DAP12 pour transmettre le signal d'activation reçu à la synapse. Il est donc crucial en utilisant les signaux de récepteurs comme NKG2D ou les NCR de s'assurer que la protéine DAP12 est en quantité suffisante pour envoyer les signaux d'activation. Puisqu'un des avantages des NK est qu'en dehors du CAR ils vont aussi détecter les molécules de stress et autres signaux d'activation à la synapse par leurs récepteurs naturels, il est important de garder une synergie et de ne pas dépasser la capacité d'intégration des signaux. Il est donc proposé dans les études de Li *et al.* de transduire DAP12 en même temps que le CAR (457). En surexprimant DAP12 il est donc possible de dépasser le niveau théorique de signaux activateurs transmis.

3.1.3. L'utilisation des NK issues d'iPSC

Les travaux de Li *et al.* contournent le problème de transduction en modifiant une lignée d'iPSC et en l'utilisant pour produire de grandes quantités de cellules NK porteuses du transgène. Cette étude pionnière utilise donc une nouvelle méthode d'immunothérapie par la production de NK dérivées d'iPSC. Si les travaux montrés au chapitre 2 permettaient de se passer d'une telle technologie, elle reste une piste très intéressante. En modifiant une lignée d'iPSC avec un CAR et en dérivant des cellules NK il est théoriquement possible de produire une quantité infinie de CAR-NK. L'avantage serait de pouvoir produire des cellules thérapeutiques qui seraient disponibles pour n'importe quel patient étant donné les capacités des NK à ne pas induire de réaction allogénique. Cette méthode bien que très prometteuse a des défauts. Les cellules générées peuvent avoir un phénotype différent et une fonction altérée (459). De plus il a été montré que les cellules issues d'iPSC peuvent être perçues comme anormales par le système immunitaire et être rejetées (460, 461). Il est aussi très important de s'assurer de la différenciation complète des cellules car les iPSC peuvent générer des tumeurs si elles ne sont pas contrôlées. En temps normal ce sont les cellules NK qui permettent le rejet des tératomes formés par les iPSC (462). Pour un patient ayant subi un traitement par chimiothérapie il est possible que les NK ne soient pas en mesure de se débarrasser du tératome.

Dans le cadre d'un traitement où le patient peut avoir un système immunitaire gravement altéré par les traitements il est important de contrôler cet effet. Si des preuves expérimentales précliniques et les premiers résultats des essais cliniques montrent que cette thérapie est envisageable (463), il est encore tôt pour savoir si cette technologie sera efficace en clinique à long terme.

3.2. La génération de nouveaux promoteurs spécifiques

3.2.1. La génération de promoteurs basés sur les enhancers déterminés par CAGE

Le problème posé par l'expression du transgène dans toutes les cellules provenant des HSC a demandé la mise au point d'un nouvel outil pour générer des promoteurs s'activant spécifiquement dans certaines populations cellulaires. La construction de ces promoteurs est basée sur une méthode classique utilisant un promoteur minimal et une séquence *enhancer* permettant l'augmentation de l'activité transcriptionnelle en fonction des facteurs qui peuvent se fixer dessus (419, 464). Des promoteurs ont déjà été générés d'une façon similaire mais en se basant sur des portions de promoteurs caractérisés contrôlant des gènes de la population d'intérêt (465). L'approche utilisée ici permet de ne pas se baser sur des promoteurs connus. En utilisant des portions de ces promoteurs connus il est possible d'isoler des séquences activatrices qui vont donner une spécificité au nouveau promoteur. Cependant, la construction complexe des promoteurs endogènes utilise souvent d'autres séquences *silencer* pour obtenir une véritable spécificité. Il devient complexe de préserver la spécificité et de maintenir une séquence suffisamment courte.

Nous avons basé notre construction de promoteur sur des éléments régulateurs identifiés par technique CAGE. Cette technologie permet de cartographier sur le génome tous les sites d'initiation de la transcription. Les éléments activateurs ont une signature CAGE propre, ils vont activer une initiation de transcription bidirectionnelle à leur proximité (439). En se basant sur ces séquences identifiées il est possible de créer des promoteurs utilisant des séquences *enhancer* ne faisant pas partie de promoteur. Ces *enhancer* distaux ont été identifiés et catégorisés selon les cellules dans lesquelles une activité CAGE a été détectée. En prenant avantage de ces données il

est possible de sélectionner de manière non-biaisée des séquences pour créer de nouveaux promoteurs.

3.2.2. Les utilisations des promoteurs spécifiques

Si le promoteur PIRATE a été généré dans l'objectif de l'utilisation de CAR dans les HSC, la méthode développée a montré la possibilité de créer un vaste panel de promoteur dont l'utilisation peut être très variée. Une utilisation évidente est pour l'utilisation en thérapie génique. Il a été montré que dans certaines maladies monogéniques, il est important de n'exprimer le transgène que dans la population d'intérêt. C'est sous le concept de génotoxicité que sont regroupés ces effets indésirables.

C'est le cas du défaut en CD40L, lorsque cette molécule est surexprimée sans spécificité elle déclenche un syndrome prolifératif dans les cellules T en développement (430). En utilisant un promoteur spécifique B tel que décrit dans le brevet il devient possible d'envisager corriger ce gène sans craindre ce syndrome.

Un autre défaut pouvant bénéficier de cette technologie est la déficience en Munc13-4. Comme vu plus haut, cette molécule est centrale dans le processus de dégranulation et son absence déclenche la lymphohistiocytose hémophagocytaire. En rétablissant cette molécule, la fonction peut être rétablie dans les cellules T et NK, cependant la surexpression ubiquitaire risque de perturber les phénomènes d'exocytose dans les autres populations (466). L'utilisation du promoteur PIRATE est donc très intéressante dans ce cas.

Un autre cas de figure où il serait intéressant d'utiliser de tels promoteurs est l'hémophilie B. Causée par un déficit en facteur IX de la coagulation, cette pathologie bénéficierait largement d'une thérapie génique permettant de rétablir la production de ce facteur. Des tests cliniques ont démontré la possibilité de rétablir une partie de la sécrétion de facteur IX par le foie (467). Cependant seule 6% de la production normale a été rétablie et a nécessité une immunosuppression. En effet, l'immunogénicité de la transduction est un problème dans ce cas. Il a été montré que la limitation de l'expression était un point clé pour limiter ce phénomène (421). L'utilisation d'un nouveau promoteur court permettrait de préserver une bonne efficacité de transduction, tout en limitant l'immunogénicité.

Un point important pour la thérapie génique est le problème de formation tumorale. Ce phénomène a été observé dans certains essais cliniques (435, 468). Ce problème est lié en partie à l'activation d'oncogène à proximité du site d'insertion du transgène. L'utilisation de promoteur ayant un niveau d'activation plus faible diminue ce risque. Un autre aspect est que le transgène peut avoir un effet similaire s'il n'est pas régulé correctement. L'exemple de la thérapie génique ciblant les gènes RAG 1 et 2 illustre ce point (469). La surexpression de ces recombinaisons sans restriction aux populations qui doivent l'exprimer risque de favoriser les phénomènes de transformation tumorale décrit plus haut, qui sont à l'origine de nombreuses leucémies.

De nombreuses utilisations cliniques sont donc possibles pour cette technologie. Il est bien entendu nécessaire de valider les promoteurs pour chacune de ces applications, mais ils représentent une solution potentielle à des problèmes technologiques importants. Il est aussi très intéressant d'utiliser ces promoteurs en laboratoire pour raffiner les modèles expérimentaux actuels en se rapprochant de niveaux d'expression physiologiques. Cette technologie est donc une nouvelle voie à explorer.

3.3. L'utilisation des HSC pour la thérapie CAR

Comme montré ici il est envisageable d'utiliser les HSC comme vecteur de la thérapie CAR. Cette approche novatrice apporte un grand nombre d'avantages mais aussi des contraintes inhérentes au comportement des cellules souches. Pour contourner ces problèmes, nous avons mis en place une nouvelle technologie de promoteur spécifique et nous avons pu démontrer qu'elle représentait bien une solution exploitable.

3.3.1. Les avantages et inconvénients des HSC dans la thérapie CAR

3.3.1.1. Les avantages de l'utilisation des HSC

L'utilisation de cellules souches pour la thérapie CAR a plusieurs avantages. La persistance des cellules greffées est évidemment le point majeur. L'importance de la persistance des cellules CAR a été démontré plus haut. En greffant des cellules porteuses du CAR, l'homéostasie de l'hématopoïèse va remplacer les cellules qui s'épuisent ou sont éliminées par de nouvelles cellules thérapeutiques. Ainsi l'afflux permanent de cellules attaquant le cancer devrait éliminer à long terme tous les clones cancéreux. Un autre avantage est le phénotype naïf des cellules générées. Il a été montré que l'expansion *ex vivo* des cellules CAR donnait un phénotype effecteur terminal aux cellules T et donc limitait leur potentiel de prolifération (470). De nombreuses études montrent que des cellules ayant un phénotype naïf ont un potentiel thérapeutique plus important car elles vont avoir un plus fort pouvoir prolifératif et vont être capable de générer des cellules mémoires qui vont persister à très long terme pour maintenir une surveillance immunitaire (471, 472). Les cellules souches vont générer *de novo* des cellules T qui auront donc ce profil naïf. Ainsi, en plus de générer continuellement des cellules portant le CAR, cette stratégie devrait produire des cellules avec un meilleur potentiel de réponse.

Un des problèmes de la thérapie CAR évoqué plus haut est le relargage d'une grande quantité de cytokines. Il a été montré que ce relargage cytokinique est corrélé à la quantité de cellules tumorales présentes au moment de l'injection des cellules thérapeutiques. Cette production massive de cytokine est donc due à l'activation du grand nombre de cellules T qui s'activent en même temps. L'un des avantages supposés de la thérapie CAR HSC serait d'avoir une réapparition progressive des cellules T qui vont exprimer le CAR. De ce fait il n'y aurait pas de production simultanée de cytokines par un grand nombre de cellules T. Il n'y aurait donc pas de toxicité de la thérapie par ce syndrome. Il reste bien entendu important de vérifier ce point en mesurant aux différents temps après la greffe des HSC les taux de cytokines dans le sang. Il s'agit d'une des prochaines étapes de ces travaux en mesurant les concentrations plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6 au vu du rôle central dans le syndrome de relargage cytokinique, dans les modèles murins humanisés.

En utilisant cette approche le patient sera traité avec ses propres cellules souches, ce qui élimine le risque de GvH, un risque majeur lors d'un traitement conventionnel par greffe allogénique. Si la quantité de cellules souches d'un patient traité par chimiothérapie peut être réduite il reste envisageable d'utiliser cette thérapie étant donné la condition autologue de la greffe qui va favoriser

le repeuplement de la niche hématopoïétique par les cellules infusées. D'autre part, un des problèmes majeur de la greffe est éliminé, à savoir de trouver un donneur compatible, favorisant donc l'utilisation de ce traitement pour des personnes ayant un haplotype de HLA rare.

Si un type de cellule défini permet d'obtenir de meilleurs résultats pour un type de cancer particulier, il est intéressant de pouvoir moduler le patron d'expression. Si les expériences décrites ici sont menées avec un promoteur restreignant l'expression aux cellules T il est possible de moduler ce paramètre. La méthode décrite dans le chapitre 3 permet de générer des promoteurs pour d'autres populations, notamment les cellules NK. Il serait intéressant de tester la même approche avec un promoteur spécifique des cellules NK étant donné leur reconstitution rapide après la greffe. Il est envisageable de combiner des séquences activatrices ou de cloner des séquences activant la transcription dans les cellules T et NK pour bénéficier de ces deux populations pour la thérapie. Si les expériences présentées ici montrent une preuve de concept en utilisant un promoteur T, il est évident qu'elles ouvrent la voie à un développement de cette technologie en utilisant d'autres promoteurs et donc d'autres populations cellulaires.

3.3.1.2. Les désavantages de l'utilisation des HSC

Bien que possédant de nombreux avantages, cette thérapie implique des contraintes et désavantages. Le premier étant inhérent à l'avantage de persistance, est que l'effet des CAR sera permanent et risque donc d'abolir à long terme la fonction B. Si cet effet a déjà été observé avec la thérapie CAR lorsque des clones T exprimant le CAR ont persisté et qu'il est possible de gérer ce problème, il reste un désavantage qui contraint le patient à un traitement à vie. Ce problème est lié à la spécificité du CAR et à son effet *off-tumor*. Dans le cadre de la leucémie, la toxicité envers les cellules B est maîtrisée mais il devient difficile d'envisager utiliser un CAR GD2 sans être certain que le traitement n'attaquera pas les cellules nerveuses.

Un des aspects à prendre en compte, même dans le cas d'une reconstitution rapide des cellules NK, est le délai entre la greffe et la reprise de l'activité immunitaire. Durant cette fenêtre de temps, le cancer peut proliférer très rapidement, sans aucune pression du système immunitaire. Des solutions sont donc à être envisagées pour protéger le patient pendant ce laps de temps. En utilisant une

injection de cellules CAR T mature il serait possible de maintenir une pression constante en les injectant peu de temps après la greffe (Figure 9). En utilisant un promoteur combinant plusieurs séquences activatrices il serait possible d'obtenir une expression du CAR dans les cellules NK et T, couvrant ainsi toutes les périodes pour maintenir une pression anti-tumorale.

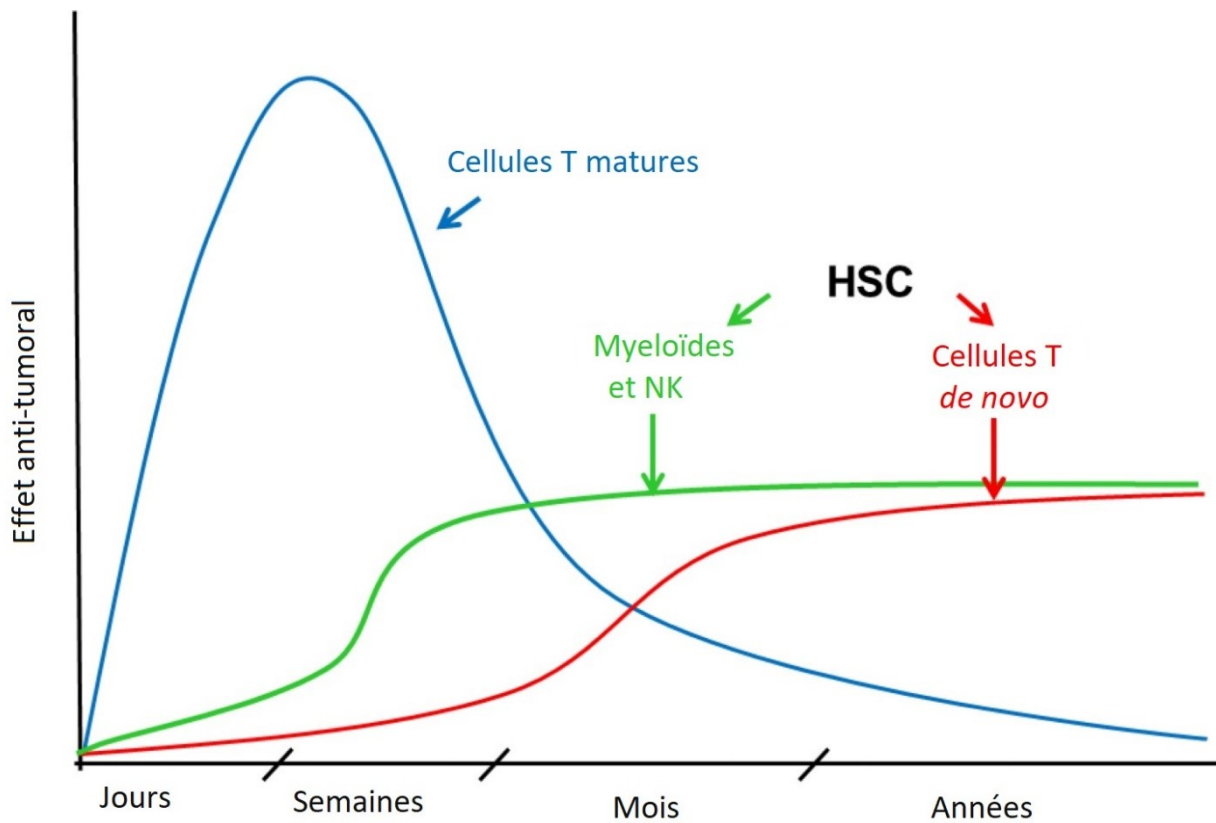


Figure 9. – Dynamique de reconstitution théorique des cellules anti-tumorales après une greffe de HSC

(traduit de Gschweng E, De Oliveira S, Kohn DB. Hematopoietic stem cells for cancer immunotherapy. Immunol Rev. ©2014;257(1):237–249. Avec l'autorisation de John Wiley and Sons)

Un autre problème est lié à l'utilisation de cellules souches et donc d'une thérapie génique intégrant des séquences de manière aléatoirement dans le génome de cellules persistantes. L'exemple des premières thérapies géniques a démontré le potentiel cancérigène d'un tel traitement (468). Ici, les vecteurs lentiviraux favorisent une insertion dans des régions peu actives et vont donc diminuer le

potentiel cancérigène (473). Ces vecteurs sont aussi modifiés pour empêcher l'activation d'oncogènes par les séquences LTR du vecteur viral. Il n'est cependant pas à exclure que la transduction génère des clones malins parmi les cellules modifiées. En utilisant une intégration dirigée il serait possible d'éviter cela. La technologie CRISPR-Cas9 permettrait d'intégrer la cassette d'expression du CAR dans des régions génomiques évitant les oncogènes. Cependant la modification de cellules souches en assez grand nombre par cette technique reste encore un défi.

Si ces défauts énoncés sont à prendre en compte, il est aussi possible d'y remédier en garantissant une élimination contrôlée des cellules modifiées. Il est possible d'intégrer à la construction comportant le CAR un gène suicide pouvant être activé par un signal externe. Il existe plusieurs de ces gènes pouvant être intégrés.

Le gène de la thymidine kinase du virus Herpes simplex (HSV-TK) permet de transformer le ganciclovir en un analogue de nucléotide qui va s'incorporer à l'ADN mais ne permet pas de continuer la polymérisation de l'ADN. En stoppant l'élongation le ganciclovir métabolisé devient donc un poison spécifique des cellules exprimant le HSV-TK (474). Des études ont déjà montré le potentiel d'utilisation de ce transgène comme sécurité chez l'homme dans une thérapie cellulaire (475). Certaines mutations ont même permis d'augmenter l'affinité de cette enzyme pour son substrat favorisant encore la sécurité d'utilisation pour améliorer l'efficacité du gène suicide et limiter les doses et donc les effets néfastes du substrat (476).

Une autre stratégie utilise une caspase inductible. Cette protéine issue du génie génétique utilise la caspase 9 qui a été fusionnée à un segment de la protéine fixant le FK503 (FKBP) qui va dimériser la protéine sous l'action de son substrat. La dimérisation va rendre la caspase active et donc déclencher l'apoptose. Un des avantages est que le la molécule induisant l'apoptose n'a pas été reportée comme bioactive et fonctionne à des doses très faibles (477). Cette construction est actuellement utilisée dans des essais cliniques de thérapie CAR (414).

En dehors de ces gènes suicides d'autres approches permettent d'éliminer les cellules modifiées au besoin. Elles se basent sur l'expression en surface d'un récepteur tronqué qui va pouvoir être ciblé par un anticorps déplétant. Les travaux de Paszkiewicz *et al.* montrent la possibilité d'utiliser une version tronquée du récepteur au facteur de croissance épidermal (EGFR) comme transgène qui permettra après la thérapie d'éliminer toutes les cellules modifiées par la simple injection de l'anticorps Cetuximab (349). Cette version modifiée d'EGFR est sécuritaire car elle ne permet pas

la fixation des ligands et ne donne aucun signal intracellulaire. En plus de l'utilisation de déplétion, il est possible d'utiliser cette protéine comme marqueur pour sélectionner les cellules transduites. Un autre gène utilisable dans cette même optique est le CD20. Le Rituximab, comme décrit plus haut a bien été caractérisé pour éliminer *in vivo* les cellules exprimant le CD20. Il a donc été prouvé de la même manière la possibilité d'utiliser le Rituximab pour dépléter des cellules CAR T (478).

Dans le cas de l'utilisation de HSC avec un CAR sous contrôle du promoteur PIRATE, il est tout à fait envisageable d'intégrer ces gènes suicides. Un second segment comprenant un promoteur fort contrôlant ces transgènes pourrait être intégré à la cassette génétique et permettrait non-seulement l'élimination des cellules exprimant le CAR, mais aussi de toutes les cellules modifiées, éliminant ainsi un risque de transformation cancéreuse uniquement lié à l'insertion du transgène. Pour éviter l'interaction potentielle d'un promoteur fort contrôlant le gène suicide avec le promoteur spécifique, il est possible d'utiliser deux transductions distinctes. En utilisant une sélection des cellules exprimant l'antigène de surface qui sera ciblé par les anticorps, on peut transduire uniquement ces cellules avec le CAR. Cette stratégie a aussi l'avantage d'utiliser des constructions moins complexes, plus facile à encapsider dans des virus recombinants, permettant donc de meilleurs taux de transduction.

3.3.2. Les HSC dans la thérapie CAR, un casse-tête immunitaire

L'utilisation des cellules souches hématopoïétiques comme vecteur de thérapie génique est très intéressante car elle permet une production d'une grande quantité de cellules CAR et permet leur renouvellement. Cependant elle apporte aussi d'autres problématiques.

L'expression d'un nouveau récepteur immunologique, en l'occurrence le CAR, apporte de nouvelles questions quant au développement des cellules T et de l'impact sur les cellules matures et leur fonction à terme. Puisque dès l'engagement dans la voie de différenciation T les cellules vont exprimer le CAR sous contrôle du promoteur PIRATE, il est important de comprendre les mécanismes qui vont potentiellement être affectés par cette expression.

3.3.2.1. Le signal tonique pendant la différenciation

Comme montré par Albert *et al.* le signal tonique peut affecter les cellules T lors de leur différenciation (438). Comme les signaux des molécules activatrices de type CD3 ou CD28 peuvent avoir un effet délétère lors de la différenciation, il est possible que les progéniteurs précoces soient affectés par le signal du CAR et arrêtent leur développement.

Il est possible que l'utilisation d'autres chaînes de signalisations ne donnent pas le même effet et soient même favorables à la différenciation. Un signal notch par exemple, pourrait améliorer la reconstitution du compartiment T. Ainsi au même titre que le signal tonique de 4-1BB dans les systèmes d'expansion *in vitro*, le signal tonique pourrait faciliter l'expansion *in vivo* des cellules T en activant plus rapidement leur différenciation. S'il est possible d'imaginer prendre avantage de cet effet, l'impact sur les cellules T exprimant le CAR une fois différenciées est difficile à prévoir et il est à envisager que l'effet thérapeutique soit atténué.

L'impact du signal tonique d'un CAR de deuxième génération utilisant le CD28 sur les progéniteurs T a été prouvé comme néfaste en bloquant la différenciation. Au vu de l'objectif d'éliminer les leucémies, il est crucial de limiter l'effet du signal tonique puisque c'est bien un CAR de ce type qui sera utilisé, ayant déjà prouvé son efficacité. Le promoteur PIRATE a montré un taux d'expression plus faible du transgène et limiterai ainsi le signal tonique lié à la surexpression. Il est donc intéressant de l'utiliser dans le cas de la thérapie utilisant des HSC pour surpasser ce problème.

3.3.2.2. La liaison du CAR avec les cellules B dans le thymus

Si le signal tonique est absent, l'expression du CAR durant la différenciation reste un paramètre nouveau. La différenciation des cellules T étant finement régulée, il est possible que le CAR interfère avec ce processus.

Les études menées par Lin *et al.* ont montré un effet de la liaison d'un récepteur chimérique immunitaire (CIR) utilisant la portion extracellulaire du CD4 fusionné aux chaînes ζ ou γ du CD3

au stade DN1 vers DN2 (448). En utilisant un segment CD4 tronqué ayant juste une portion externe, ils ont montré que l'interaction seule ne bloquait pas la différenciation, mais que le signal par les ITAM du segment CD3 entraînait un arrêt de la différenciation. Dans ce cas, l'expression du transgène va induire un signal via les ITAM du CD3, mimant une liaison TCR en réponse à l'interaction avec le MHC de classe II et pourrait donc induire un signal de trop grande affinité qui aboutit à l'apoptose. Donc, la liaison du CIR avec son ligand a le potentiel de transmettre un signal d'autoréactivité qui va entraîner la mort cellulaire.

Dans le cadre du CAR sous le contrôle du promoteur PIRATE, nos données *in vitro* nous suggèrent que le premier lieu où le CAR pourrait être exprimé est la moelle osseuse où les pro-T vont commencer leur différenciation. Dans le contexte de la niche des HSC, il est possible que les progéniteurs T rentrent en contact avec des cellules B. Bien que les travaux de Albert *et al.* montrent que ce n'est pas l'interaction du CAR avec son antigène qui bloque le développement, mais le signal tonique, il est important de vérifier cet effet. Il est possible qu'à ce stade la liaison du CAR n'impacte pas encore la différenciation.

Une fois dans le thymus, les cellules B sont présentes surtout dans la zone sub-capsulaire (479, 480), à ce moment il pourrait y avoir interaction du CAR avec l'antigène. Toutefois, pendant la sélection thymique les cellules T ne sont pas encore fonctionnelles et ne peuvent donc pas attaquer les cellules B. À l'inverse il est possible que la sélection thymique élimine les clones qui s'activent trop. Il y aurait alors une sélection négative des cellules T exprimant le CAR comme dans le cas présenté par Lin *et al.* Si tel est le cas, il serait donc impossible de produire des cellules CAR T par la greffe de HSC.

Cette théorie semble invalidée par les travaux de Larson *et al.* et De Olivera *et al.*, qui ont montré que la transduction d'un CAR de seconde génération ciblant le CD19 permet la greffe et le développement de HSC humain dans un modèle murin humanisé (437, 481). Si dans ce cas des cellules CD3 positives exprimant le CAR en circulation ont été détectées, il est à noter que les cellules T humaines ne se différencient pas dans un thymus humain mais dans celui de la souris, dans ce modèle murin humanisé. Nos observations semblent confirmer ce résultat dans un modèle humanisé comportant un thymus humain. Il est donc probable que l'effet observé par Albert *et al.* du signal tonique soit absent juste à cause du modèle expérimental. En revanche, la liaison du CAR sur les cellules B qui sont bien présentes dans notre modèle ainsi que dans les travaux

précédemment cités, n'a pas bloqué le développement des cellules CAR. Il semble donc que la liaison d'un CAR sur sa cible pendant le développement puisse bloquer la différenciation mais cet effet dépend de la cible et des interactions qu'elle implique. Pour confirmer ces hypothèses nous voulons étudier le développement du répertoire TCR dans le contexte de notre modèle murin humanisé. Les cellules T issues des HSC modifiées avec le CAR sous contrôle du promoteur PIRATE seront isolées et leur TCR sera séquencé. Les résultats permettront de déterminer l'impact sur la régulation du TCR et sur le développement T de l'expression du CAR avec le promoteur PIRATE ou un promoteur fort.

Globalement, les travaux présentés ici écartent le problème du signal tonique pendant la différenciation et utilisent un promoteur qui minimise cet effet. De plus, la fixation du CAR sur les cellules B ne semble pas induire de signal de mort pendant le développement. Tout porte à croire que le développement des cellules T exprimant le CAR sous le contrôle du promoteur PIRATE devrait aboutir. Il reste important de valider cette hypothèse dans un modèle non humanisé où l'ensemble des populations immunitaires est présent et où la différenciation est plus stable, comme un modèle de greffe entièrement murin.

3.3.2.3. Une tolérance du signal CAR ?

De manière intéressante, il apparaît, dans les travaux de De Olivera *et al.* ainsi que dans nos résultats, qu'une population B reste présente en périphérie malgré la présence de cellules T exprimant un CAR dirigé contre elles. Ceci suggère que l'activité du CAR pendant la différenciation donne une « éducation » qui permet de tolérer les cellules B conventionnelles.

Une des explications potentielles serait l'expression du CAR sur les cellules B avec un promoteur non spécifique. Il a été rapporté que l'expression du CAR à la surface des cellules B va permettre à ce dernier de se lier sur l'antigène à la surface des cellules B, masquant ainsi l'épitope cible (482). Si cet effet permettait de préserver des cellules B, il y aurait alors une pression de sélection qui ne permettrait qu'aux cellules B exprimant le CAR de survivre, or il est montré que des cellules n'exprimant pas le CAR survivent en périphérie, excluant donc cette hypothèse.

Lors de la sélection thymique les cellules T vont être éliminées si leurs signaux activateurs sont trop forts, ce qui corrèle en temps normal avec un TCR auto-réactif. L'expression du CAR pendant la sélection va envoyer des signaux qui simulent une interaction du TCR par les ITAM de la chaîne CD3 ζ du CAR. Il est donc possible que le CAR dans ce contexte de différenciation soit perçu comme un second TCR. Si les signaux cumulés des deux récepteurs sont trop fort, les cellules T seront éliminées. Si le TCR a une faible affinité et qu'il ne signale pas, mais que les signaux envoyés par le CAR sont suffisants, la cellule T pourrait survivre et progresser jusqu'au stade mature. Un signal CAR trop fort en réponse à une fixation avec les cellules B pourrait, à l'opposé, éliminer les clones T. Dans un cas de surexpression, ce dernier cas est envisageable. Dans ce sens, le CAR pourrait se comporter comme un simili-TCR qui aurait été contrôlé par la sélection thymique et générerait des cellules avec une réactivité atténuée pour son signal, contrairement aux cellules T transduites matures (Figure 10).

La réactivité des T au signal CAR en périphérie pourrait donc être moindre. Cependant, les signaux renvoyés par un engagement complet du TCR comporte un nombre bien plus grand d'ITAM qu'un CAR et utilise également des signaux de costimulations qui favorise leur phosphorylation en recrutant les kinases associées. Il y aurait donc besoin d'un engagement de nombreux CAR si aucun autre récepteur n'envoie de signal de survie. Encore une fois, comme le TCR, le CAR devra donc permettre la survie des T. Ce modèle serait donc compatible avec les observations de cellules T se développant correctement avec un CAR.

Si ce modèle est juste, l'interaction avec le CAR pendant la sélection thymique pourrait biaiser le répertoire TCR. En effet, comme le CAR envoie un signal lors de sa liaison avec les cellules B du thymus, un signal activateur minimal sera envoyé. Un TCR qui normalement serait hyporéactif pourrait être suffisant pour faire survivre une cellule T grâce à la synergie avec le CAR. À l'inverse, un TCR qui aurait une forte affinité et qui survivrait en temps normal à la sélection, pourrait dépasser le seuil de signaux activateurs à cause du CAR et sera donc éliminé (Figure 10). Il y aurait donc un décalage de la tolérance des TCR. Cette hypothèse peut être testée dans notre modèle en séquençant les TCR des cellules T s'étant développées avec le CAR et en étudiant leur affinité.

S'il est possible que l'intensité de l'activation des cellules T soit moindre lors de l'engagement du CAR sur les cellules B saines, il est aussi possible de perdre en réactivité face aux cellules

cancéreuses. Cependant ces dernières exprimant également des marqueurs de stress ou présentant un antigène qui va activer les cellules T par leur TCR pourrait entraîner une reconnaissance synergique du CAR et du TCR ou des récepteurs d'immunité innée comme les NCR ou NKG2D (Figure 10). Cette reconnaissance permettrait d'éliminer les blastes leucémiques sans atteindre aussi profondément le compartiment B que des cellules T mature préparées *ex vivo*. Si c'est le cas, cet effet serait intéressant dans le contexte de cibles comme le GD2 qui nécessite une réponse atténuée contre les cellules saines.

L'expression du CAR sous contrôle de PIRATE permettrait de minimiser l'impact du signal tonique mais il est peut-être important de ne pas exprimer le CAR pendant la différenciation; Soit pour ne pas interférer avec la sélection qui pourrait éliminer les cellules exprimant le CAR ou biaiserai le répertoire TCR, soit pour éviter la production de cellules hyporéactives au CAR. Dans ce cas le PIRATE ne serait pas adapté mais l'approche en elle-même reste valide, il faudrait générer un autre promoteur qui n'activerait l'expression du CAR qu'après la sélection thymique ou en réponse à un autre stimulus. Nos résultats actuels ainsi que la littérature semblent montrer que le PIRATE convient à l'utilisation du CAR dans les HSC mais il reste à valider cette thérapie et le modèle de développement qui en découle.

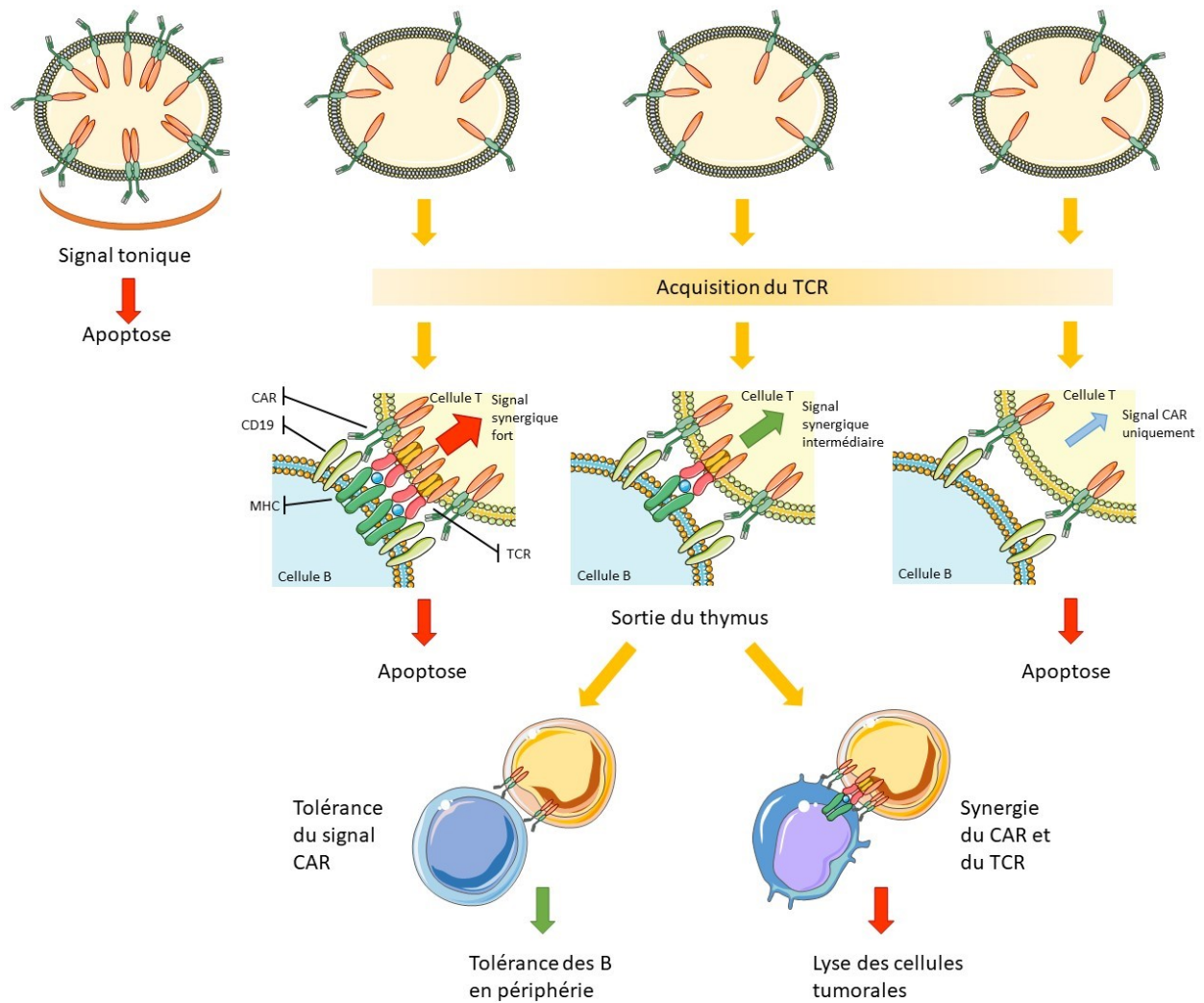


Figure 10. – Schéma du modèle de différenciation proposé

(créé avec Servier Medical Art, license Creative Common Attribution 3.0 Generic License.

<http://smart.servier.com/>)

4. Futur de la thérapie CAR

4.1. Les combinaisons d'immunothérapie

Si le nouveau champ de possibilités qu'offre l'utilisation des CAR NK ou les CAR HSC est intéressant, il n'en demeure pas moins que les thérapies CAR n'ont pas permis une rémission stable dans tous les patients. L'idée de combiner les effets des CAR avec d'autres approches d'immunothérapie pourrait permettre d'augmenter leur impact sur les cellules cancéreuses.

4.1.1. Combinaison avec les inhibiteurs de point de contrôle

L'utilisation conjointe des inhibiteurs de point de contrôle et des cellules CAR T est actuellement testée. Il est intéressant de combiner ces approches vu l'importance de l'activation et de la prolifération des CAR T pour obtenir un effet maximal. Le blocage de PD1 va permettre de maintenir les cellules T activées en de prolonger la phase d'expansion. Cet effet synergique théorique est actuellement en essai clinique (483). De même que PD1, CTLA4 aura un effet bénéfique. Comme CTLA4 va permettre d'augmenter l'expansion initiale des cellules CAR T, ce qui a été montré comme un point important pour l'efficacité de la thérapie CAR. Cette combinaison est aussi un point à tester dans le cas de l'utilisation des CAR dans les cellules NK. Bien que les cellules NK aient une durée de vie plus courte que les cellules T (484), il serait intéressant de potentialiser leur effet en bloquant les signaux inhibiteurs. De la même manière en utilisant des HSC il reste possible d'utiliser des anticorps bloquants. Si la génération continue de cellules CAR permet de surpasser la disparition des cellules thérapeutiques, il reste à envisager un bénéfice sur l'effet anti-tumoral du blocage des voies d'inhibition PD1 et CTLA4.

Un point important de combiner les approches des inhibiteurs de point de contrôle avec les CAR est que ces deux approches ont eu des résultats positifs dans des cancers différents. Les anti-PD1 et anti-CTLA4 ont permis de traiter des cancers solides avec un taux de mutations élevé alors que les CAR sont très efficaces contre les leucémies qui ont peu de mutations. Ce résultat semble

montrer que les inhibiteurs de points de contrôle vont favoriser l'activation contre des tumeurs établies qui ont mis en place de nombreux mécanismes d'évasion alors que les CAR permettent de tuer des cellules ayant un profil de mutation faible mais donc aussi peu d'antigènes tumoraux. Cette approche est donc un moyen de changer deux paramètres de pression de sélection immune en même temps.

4.1.2. Combinaison avec les cytokines

L'utilisation de cytokines en parallèle de la thérapie cellulaire a déjà montré des effets bénéfiques. Une étude utilisant des lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL) expandus *ex vivo* a utilisé la dose maximale d'IL-2 tolérable pour favoriser leur effet lors de la réinjection. De plus, de nouveaux biomimétiques pourraient permettre de favoriser l'action voulue sur les T cytotoxiques. Un analogue de l'IL-2 a, par exemple, été montré comme efficace pour stimuler les cellules cytotoxiques par les récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15 sans se fixer au récepteur CD25 qui favorise la prolifération des cellules T régulatrices (485).

Si cet effet est intéressant, il est possible que l'action conjointe des cellules CAR qui peuvent déclencher un syndrome de relargage cytokinique, avec une injection de cytokines comme l'IL-2 ou l'IL-15 puisse déclencher de graves effets auto-immuns. Pour pallier à ce problème, il est possible, au lieu d'injecter des cytokines purifiées, d'utiliser les cellules génétiquement modifiées pour produire *in vivo* au site tumoral les cytokines désirées. Cette stratégie a été testée avec l'IL-12 (486, 487).

4.1.3. Les CAR « en armure »

Les combinaisons peuvent donc se faire par la transgénèse et les cellules thérapeutiques peuvent servir de vecteur. Ce cas présente plusieurs avantages. Le premier est l'adressage de la sécrétion de cytokines au site tumoral. Les cellules thérapeutiques vont être attirées par la réaction immunitaire vers les cellules cancéreuses et vont donc sécréter les cytokines à leur proximité. Le

second avantage est la double action des cytokines, elles vont stimuler les cellules CAR mais aussi toutes les cellules immunitaires étant à proximité. Le dernier avantage est qu'il n'est plus nécessaire d'injecter régulièrement des cytokines synthétisées *in vitro* au patient. Ce dernier point permet donc un traitement cytokinique en en diminuant les coûts. Étant donné que les cellules injectées sont modifiées génétiquement il est simple d'inclure dans le transgène une séquence codante pour une cytokine, cette stratégie est donc très intéressante pour faciliter la combinaison entre CAR et cytokines (488, 489).

Les travaux de Liu et al. ont montré l'efficacité de transduire conjointement un CAR et l'IL-15 dans les cellules NK (414). La méthode de transduction des NK exposée au chapitre 2 a permis d'insérer des transgènes complexes facilement dans les cellules, elle rend donc plus simple l'utilisation de ces stratégies qui nécessite une transduction efficace.

De la même manière que les cytokines l'expression de récepteurs de costimulation permettra une aide localisée pour la réponse immunitaire. Une étude intégrant le ligand de 4-1BB au transgène inséré dans les cellules CAR vise à démontrer cet effet synergique. Encore une fois l'effet sera bénéfique pour les cellules infusées autant que pour les cellules déjà présentes au site tumoral. Il est également possible d'inclure un transgène permettant l'inhibition de point de contrôle comme PD1 dans cette même approche. Des études intégrant un second récepteur chimérique qui comporte la portion extracellulaire de PD1 fusionnée avec un segment costimulateur CD28 intracellulaire sont en cours. Transformant ainsi le signal inhibiteur PD1 en signal stimulateur (490, 491).

4.1.4. Les combinaisons de CAR

4.1.4.1. Deux CAR pour une même cellule

Si la combinaison des approches est intéressante, une combinaison de plusieurs thérapies CAR permettra de résoudre un autre problème, la perte de l'antigène de surface. Dans les nombreuses études cliniques utilisant des CAR, un grand nombre de patients ont une bonne réponse initiale et des cellules T exprimant le CAR persistantes, mais ils rechutent tout de même car un clone négatif pour la cible du CAR se développe. Les résultats montrés ici (Chapitre 2) démontrent l'efficacité

de l'expression de deux CAR par la même cellule. Les cellules NK modifiées par ce double CAR ont été capables de tuer efficacement des cellules ayant perdu l'expression du CD19 ou du CD22. Les deux CAR peuvent donc cohabiter sur la même cellule et rester efficace. Cette stratégie tire encore une fois parti de la pression de sélection immunitaire. L'analogie avec les traitements antibiotiques pour éliminer les bactéries est révélatrice de l'impact que pourrait avoir cette stratégie, l'utilisation simultanée de deux antibiotiques différents permet l'élimination de l'infection. Ainsi, en appliquant une pression de sélection qui nécessite la mise en place de deux systèmes d'évasion indépendants, les cellules cancéreuses auront moins de chance d'échapper à la thérapie CAR.

Une autre approche pour obtenir cette double spécificité est d'utiliser un CAR unique qui va avoir un double scFv. En fusionnant à l'extrémité externe une seconde séquence codant pour un scFv donnant une autre spécificité, il est possible de donner au CAR la capacité de lier l'une ou l'autre des molécules cibles (492). Si cette méthode a montré une bonne efficacité, elle a le désavantage d'imposer une organisation complexe des segments de reconnaissance. Comme mentionné plus haut, la distance entre le scFv et la membrane est importante pour la bonne fixation de la molécule cible. Dans ce cas si les épitopes ne sont pas positionnés correctement il peut y avoir une gêne allostérique pour que le fragment d'anticorps lie son antigène. S'il n'est pas impossible d'utiliser une telle construction elle impose certaines contraintes. Un autre point est que le signal tonique comme vu plus haut peut être influencé par la liaison entre eux des scFv. En rapprochant ceux-ci et en complexifiant leur organisation il est possible que le signal tonique soit amplifié et entraîne un épuisement cellulaire rapide dans les cellules injectées.

4.1.4.2. Un CAR pour deux cellules différentes

Si les cellules T et NK ont des points communs, comme vu plus haut, elles utilisent des mécanismes de reconnaissance différents et ont un effet synergique en temps normal dans la surveillance anti-cancéreuse. Il est donc intéressant de prendre parti de leurs deux effets pour faciliter la thérapie CAR. S'il est imaginable d'utiliser deux populations générées séparément, puis infusées en

parallèle, il est aussi possible d'utiliser des systèmes de culture cellulaire qui permettent d'amplifier les deux populations en parallèle. Le système d'expansion de cellules cytotoxiques induites par cytokines (CIK) permet d'amplifier une population mixte de cellules NK, T et NKT (493). En utilisant ce système pour la thérapie CAR, il devient possible d'améliorer la thérapie en combinant les populations. Il a également été démontré que les macrophages pouvaient être utilisés avec des CAR et était capable de phagocyter des cellules cancéreuses suite à l'activation d'un CAR (494-496). L'utilisation des macrophages en parallèle des cellules T ou NK pourrait favoriser une destruction de l'environnement tumoral. Cette combinaison pourrait facilement être mise en place avec la stratégie utilisant les HSC. En générant un promoteur issu de combinaisons de séquences *enhancer* donnant une expression sur ces différentes populations, il devient possible avec un seul produit de thérapie cellulaire d'utiliser toutes ces cellules en combinaison.

4.2. Traitement des cancers solides

Tous les résultats montrés dans les chapitres 2 et 3 démontrent l'application de l'immunothérapie dans le contexte de la leucémie. Bien que la spécificité du CAR détermine la cible dans ces expériences, la preuve de concept qui est apportée pourrait tout à fait s'appliquer à des cancers solides. De nombreuses cibles sont déjà testées pour les cancers solides comme vu plus haut. Il est donc possible pour la thérapie CAR-NK, comme pour la thérapie HSC, de changer de construction de CAR pour cibler un cancer solide.

4.2.1. Le problème de persistance

Un des problèmes observés avec le traitement des tumeurs solides est le manque de prolifération des cellules thérapeutiques au début du traitement par les CAR. Il semble que le microenvironnement que représentent les cancers solides inhibe plus facilement les CAR T. Comme vu plus haut, les tumeurs peuvent mettre en place un large panel de mécanismes d'évasion. Les tumeurs solides vont concentrer dans leur environnement des cytokines anti-inflammatoires, des macrophages de type

M2 immunomodulateurs et maintenir l'hypoxie. Il est donc plus difficile de déclencher une réaction contre ces tumeurs que contre un cancer liquide tel que la leucémie. Les stratégies de combinaisons comme vu plus haut sont donc un axe de recherche important car il pourrait prolonger la durée de vie des cellules CAR.

Pour empêcher le phénomène d'inhibition de l'expansion, Kagoya et al. ont utilisé un CAR intégrant des segments du récepteur à l'IL-2 pour contrer les effets du microenvironnement et ont montré des résultats positifs contre des lignées cellulaires de mélanome en modèle murin. Comme mentionné plus haut la combinaison des signaux a permis un effet persistant des CAR. Malgré un effet amélioré de ce nouveau CAR les souris ont tout de même développé une tumeur (458).

Un autre groupe a montré que l'utilisation du signal de costimulation inductible des cellules T (ICOS) dans les CD4 permettait une meilleure expansion initiale des cellules T. En transduisant les CD4 avec un CAR comprenant un segment ICOS, et les CD8 avec un CAR comprenant le signal CD28 Guedan *et al.* ont montré que les cellules CD4 favorisaient l'expansion initiale et les CD8 maintenaient une activité cytotoxique soutenue par les cytokines sécrétées par les CD4 (497). Ces résultats montrent l'importance de la compréhension des signaux et de leurs implications dans la réponse immunitaire pour développer des thérapies efficaces. L'ajustement des signaux transmis par les CAR est crucial pour obtenir un effet suffisant contre les cancers solides. Ce type de stratégie permet également d'utiliser deux cibles différentes si cela est nécessaire pour distinguer les cellules saines des cellules cancéreuses.

4.2.2. Les cibles pour les tumeurs solides

Un problème majeur avec les tumeurs solides est d'ailleurs de déterminer une cible thérapeutique. Si les leucémies B ont pu être ciblées aussi efficacement c'est qu'un antigène fortement exprimé et présent sur une vaste majorité des cancers était disponible. De plus, comme vu plus haut, la toxicité de la thérapie CAR dans les ALL n'est pas un problème vital. En revanche une cible exprimée par un organe vital comme le pancréas n'est simplement pas utilisable à cause de la toxicité.

4.2.2.1. EGFR et EGFRvIII

Pour déterminer une cible thérapeutique efficace, comme vu plus haut, il est important de cibler une molécule de surface qui soit présente sur les cellules cancéreuses avec une bonne densité sans retrouver cette molécule sur le tissu sain. Logiquement, les molécules favorisant la prolifération qui sont dérégulées dans le cancer sont des cibles idéales, leur expression est favorisée par le cancer pour se maintenir et sera différente du tissu sain. L'EGFR est une cible intéressante. Son expression est dérégulée dans de nombreux cancers et en fait donc un antigène pouvant être ciblé. Cependant, si les cellules cancéreuses surexpriment l'EGFR, il est toujours présent en moindre quantité sur des nombreux autres types cellulaire. Certaines stratégies ont permis d'ajuster la réponse T en fonction de la densité d'expression. En utilisant un fragment scFv dérivé du nimotuzumab, qui a une affinité réduite pour l'EGFR, les cellules CAR ne s'activent que face à des cellules exprimant des niveaux élevés d'EGFR (498). Dans ce genre d'approche l'utilisation de cellules NK, pouvant en parallèle détecter des ligands de stress pour donner une synergie avec le signal induit par une faible liaison des récepteurs CAR, serait un atout intéressant.

Une forme ayant une délétion dans la portion extracellulaire l'EGFRvIII est exclusif au cancer (499). Cette protéine mutée est constitutivement active et favorise donc la prolifération des cellules, environ 30% des glioblastomes exprime ce récepteur. Il s'agit donc d'une molécule qui est testée pour la thérapie CAR actuellement en essai clinique (500). Il s'agit d'un exemple de néo-antigène parfait puisqu'il est exprimé en surface, n'existe que sur les cellules tumorales et son expression a peu de chance d'être perdue vu l'avantage prolifératif qu'il donne.

4.2.2.2. Le GD2 pour le neuroblastome

Une autre cible intéressante présente sur de nombreux neuroblastomes est le disialganglioside (GD2), un glycolipide présent au stade embryonnaire sur le feuillet ectodermal. Le neuroblastome et certains mélanomes ont pour origine des cellules embryonnaires de ce feuillet et vont donc conserver l'expression du GD2. Un CAR ciblant le GD2 a donc été développé, cependant le GD2 est toujours présent à la surface de certaines cellules nerveuses et va donc déclencher une réaction

des CAR T contre du tissu sain. Des essais cliniques ont montré que malgré les résultats pré-cliniques en modèle murin, l'injection était bien tolérée par les patients (501, 502). Cependant, les effets n'ont pas été aussi spectaculaires que dans le cas de la leucémie. Pour améliorer ces résultats certaines stratégies visent à augmenter l'affinité du CAR pour le GD2. En testant une version mutée de ce CAR des cas d'attaque du système nerveux ont été reportés dans des modèles murins (503). Si le GD2 est une cible intéressante elle reste risquée. Il semble que la fenêtre entre l'efficacité thérapeutique et la neurotoxicité soit restreinte et nécessite donc une mise au point précise. Les cellules NK sont intéressantes dans le cas du CAR anti-GD2 car l'inhibition par les autres récepteurs NK permettrait potentiellement une atténuation de l'activation face à des cellules saines. L'étude des CAR-NK utilisant comme cible le GD2 serait donc une perspective des travaux présentés dans le chapitre 2.

4.2.2.3. Les futures cibles des CAR, l'exemple de Tn-MUC1

De nouvelles cibles pour les cancers solides sont actuellement testées. Il semble qu'une forme anormalement glycosylée de la mucine 1 (MUC1) soit une cible de choix commune à de nombreux cancers. La mutation d'une protéine chaperonne COSMC (pour « core 1 β 3GalT specific molecular chaperone ») dans de nombreux cancer, ne permet pas la fonction correcte de l'enzyme T-synthase qui a pour rôle la fixation d'un galactose sur l'antigène Tn (504). En laissant cet épitope potentiel non glycosylé à la membrane il devient une cible potentielle qui n'est jamais présente sur les cellules saines dont la fonction de COSMC est normale. Les travaux de Posey *et al.* ont montré la génération d'un nouveau CAR capable de cibler précisément cet antigène sur la mucine. Le CAR dirigé contre la Tn-MUC1 a montré des résultats précliniques efficaces dans un modèle murin de tumeur pancréatique (399).

Contrairement à d'autres CAR dirigés contre des molécules surexprimées dans les cancers solides, comme celui ciblant la carboxy-anhydrase IX (CAIX) qui ont déclenchés des effets *off-tumor* dangereux (505), l'antigène Tn-MUC1 semble donner de bons résultats sans déclencher d'effet *off-tumor*. La sécurité d'utilisation de ce nouveau CAR permettra donc son utilisation clinique. Un des effets intéressants est que la sécrétion d'IFN- γ semble corrélée à la densité d'expression de Tn-

MUC1. Il semble donc important que le cancer ciblé ait une expression suffisante pour que le traitement fonctionne à son plein potentiel, demandant un phénotypage avant le traitement.

La diversité des cancers solides et leurs caractéristiques communes avec les cellules saines des tissus dont ils dérivent demandent une adaptation de la cible selon le cancer traité. Un même type de cancer peut avoir ou non l'expression d'une molécule cible. Il est donc important de déterminer le phénotype du cancer pour sélectionner le CAR à utiliser. En ce sens, les CAR deviennent une médecine personnalisée qui s'adapte à chaque situation. La versatilité de la construction de molécules artificielles permet d'adapter le traitement. Les travaux présentés ici montrent également qu'en plus des différentes constructions il est possible de les utiliser sur différents types cellulaires, augmentant encore le panel d'outil thérapeutique et leurs propriétés. Il est donc envisageable que les cellules T, NK ou les HSC soient toutes utiles dans un contexte différent voir combinées pour s'adapter au cas de chaque patient.

A l'heure actuelle, nous savons que pour rediriger la thérapie CAR, le simple changement de scFv ne suffit pas. Chaque scFv va avoir sa propre dynamique de signal tonique qu'il faut prendre en compte, selon le microenvironnement il sera nécessaire d'intégrer certains segments de costimulation ou de combiner le traitement CAR avec des inhibiteurs de point de contrôle et des cibles qui comportent des risques pour l'effet *off-tumor* devront être gérées différemment. En ce sens, le futur de la thérapie CAR nécessite de comprendre l'interaction de leur signaux dans le contexte complexe de chaque cancer. Il semble donc que le futur des CAR ne soit pas une solution unique efficace pour tous les cas, mais un panel de thérapies et de combinaison pour s'adapter à chaque patient.

4.3. La découverte de nouvelles cibles

Le futur de la thérapie par les CAR va nécessiter le développement de nouvelles approches pour identifier des cibles thérapeutiques potentielles. L'exemple de Tn-MUC1 montre le potentiel d'utilisation des modifications post-traductionnelles comme cible thérapeutique. Il est donc important de ne pas centrer toutes les approches d'identification de cible sur des mutations de

molécules précises, mais aussi sur les antigènes générés par des problèmes de glycosylation, les erreurs d'adressage à la membrane ou les épissages aberrants.

4.3.1. Le séquençage pour déterminer de nouvelles cibles

Pour identifier des mutations récurrentes sur les cancers et les modifications des protéines qui en découlent, de nombreuses approches de séquençage du génome des cellules cancéreuses issues de biopsies ont été mises en place.

La banque de données collaborative « *The Cancer Genome Atlas* » vise à reporter pour chaque type de cancer les données génomiques issues du séquençage de biopsies de tumeurs (506). En regroupant pour chaque échantillon les données d'ADN génomique, d'épigénétique, d'ARN messagers, de protéomique et les données cliniques du cas de cancer, cette initiative vise à donner un outil pour comprendre et guérir le cancer. Cette initiative permet d'associer le phénotype clinique avec le nombre et le type de mutations et donc de déterminer des marqueurs pronostiques. Par analyse bio-informatique, il devient également possible de lier les données génétiques entre elles pour comprendre comment interagissent les mutations et donnent un phénotype malin et résistant aux cellules. Dans le cadre de l'immunothérapie, il est très intéressant de discerner les mutations et changements épigénétiques imposés par la pression de sélection immunitaire pour les cibler dans les thérapies.

Le séquençage permet de détecter les fusions de gènes, et les mutations, initiatrices du cancer mais également les mutations subséquentes qui vont activer certaines voies de signalisation communes à différents cancers. Par cette approche, il est possible de déterminer des molécules mutées communes à différents cancer qui seraient des cibles thérapeutiques potentielles d'immunothérapie. Les données de protéomique permettent de valider la présence de ces molécules et leur conformation. En isolant ces molécules pour immuniser des animaux et en générant des hybridomes des cellules B récoltées, il est possible de générer de nouveaux scFv qui pourront servir pour la construction de nouveaux CAR.

4.3.2. L'immunopeptidome comme cible

Une autre approche utilise la présentation antigénique par le MHC pour déterminer de nouvelles cibles. Il est clair que la reconnaissance des néo-antigènes des tumeurs par les cellules T est cruciale pour leur élimination. Cette reconnaissance est centrée sur la dégradation de protéines en peptides présentables par le MHC. Lors de la dégradation des protéines les peptides générés ne sont pas simplement des fragments de la protéine initiale, il peut y avoir un épissage qui va fusionner deux portions distantes de la protéine (507). Dans certains cas les protéines mutées dans le cancer vont générer par ce mécanisme des peptides différents des cellules saines et vont donc déclencher une réponse T. En utilisant la spectrométrie de masse, il est possible d'identifier les peptides présentés par le MHC et, par analyse différentielle, il est possible de déterminer quels peptides vont pouvoir déclencher une réponse T (508, 509). Il est alors possible de pulser des cellules T avec ces ensembles de peptides pour amplifier *ex vivo* des cellules T réactives contre le cancer. L'antigène NY-ESO-1 est un exemple d'antigène récurrent dans de multiples cancers, qui est utilisé pour l'immunothérapie (510).

4.3.3. Approches expérimentales de découverte de cible

En utilisant des modèles *in vitro* il est également possible de déterminer quelle mutation peut mettre en place une résistance face au système immunitaire ou à une immunothérapie par une technique de criblage par CRISPR-Cas9 (courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées). En utilisant une bibliothèque de guide CRISPR, il est possible de générer des mutations à travers tout le génome dans un modèle de lignée cancéreuse, puis d'appliquer une pression de sélection immunitaire en co-cultivant la lignée avec des cellules T ou NK. Le séquençage des guides CRISPR dans les clones survivant donnera une indication des gènes mutés qui ont conféré une résistance face au système immunitaire. Il est possible ainsi d'identifier des gènes favorisant l'évasion et de mettre en place des traitements limitants cet effet.

Ces approches montrent les possibilités d'utiliser les données de génomique pour diverses approches d'immunothérapie. Il serait donc possible à long terme de mettre en place un catalogue

de cibles d'immunothérapie et, par phénotypage de chaque cancer, utiliser les méthodes les plus adaptées à chaque patient.

5. L'éthique des nouvelles thérapies

Les nouveaux outils générés par génie génétique comme les CAR, les anticorps monoclonaux ou les cytokines modifiées apportent des outils pour le traitement du cancer mais leur action est difficile à anticiper. Leur dynamique pharmacologique, si elle peut être ajustée, ne peut être complètement contrôlée. Leur conception est orientée vers une mécanique particulière, mais il est tout à fait possible qu'ils agissent d'une façon imprévue, soit de manière bénéfique comme les cytokines fusionnées à des anticorps qui ont pu faciliter la biodistribution, soit négative comme le signal tonique des CAR. La pharmacodynamique et l'inflammation induite par les cytokines, la GvHD suite à la greffe de moelle, l'épuisement cellulaire engendré par les inhibiteurs de point de contrôle ou les CAR et le syndrome de relargage cytokinique induit par ces derniers, sont autant de preuves que la biologie synthétique n'est pas encore maîtrisée. Il est globalement difficile de prévoir l'effet des immunothérapies, surtout quand ce sont des molécules chimériques qui n'existent pas naturellement. Il est donc important de garder en tête tous les effets potentiels d'une thérapie.

Dans tous ces cas, le traitement cible des patients atteint de cancer, souvent à un stade avancé et souvent dans une impasse thérapeutique. C'est donc un contexte particulier dans lequel sont testées les thérapies anti-cancéreuses. Les patients étant condamnés lorsque le cancer n'est pas curable par les méthodes conventionnelles, ils risquent d'accepter des thérapies qui peuvent s'avérer encore plus toxiques ou réduisant encore leur qualité de vie. Il est important d'encadrer ces essais cliniques en définissant des critères d'inclusion stricts et en informant le patient et son entourage des risques. Il est important de ne pas présenter ces traitements, même ayant donné de bons résultats, comme des thérapies avec une capacité reconnue mais bien comme expérimentaux et donc difficile à anticiper.

Un aspect majeur discuté autour de ces thérapies innovantes et leur coût financier très élevé. Actuellement le prix d'un traitement par des CAR T est entre 370 000 \$US pour le produit de

Gilead, et 475 000 \$US pour celui de Novartis (511). Dans le cadre d'un système public comme le nôtre, des coûts si élevés ne sont pris en charge que par le système de santé et ne peuvent être payés par les patients directement. Il est donc important de s'assurer que ces prix ne bloquent pas l'accès aux soins.

Modification génétique, molécules chimériques, transplantation et auto-transplantation, toutes ces applications sont une façon d'aller au-delà des possibilités du corps humain que l'on ne maîtrise pas encore parfaitement. Une question d'éthique intéressante est de savoir s'il est acceptable de dépasser les capacités biologiques du corps et dans quelle mesure. Dans le cadre de la thérapie contre le cancer il est clair que cela est justifié. Cependant, comme l'ablation mammaire pour les femmes présentant un haut risque de cancer du sein, il serait possible de mettre en place des thérapies géniques pour des patients à risque d'un cancer particulier. Si à l'heure actuelle les traitements sont trop lourds et coûteux, il est possible qu'à l'avenir il soit possible d'offrir un tel service. Ces approches posent donc la question des limites du corps et de la médecine. Est-il acceptable de modifier le patrimoine génétique humain volontairement pour prévenir des maladies ? Et si c'est le cas, quel en sera le coût et qui l'assumera ? Il serait regrettable de voir des technologies aussi avancées, pouvant améliorer la vie de toute la population, réservées à une partie de la population uniquement pour des considérations financières.

Chapitre 6 – Conclusion

La thérapie CAR a pavé la voie des nouvelles thérapies cellulaires et géniques. Le succès que cette approche a rencontré a démontré le potentiel de la biologie synthétique et l'importance du génie génétique pour augmenter le potentiel des cellules. Bien que le succès initial de la thérapie n'ait pas persisté à long terme chez tous les patients, il a permis de lancer de nombreuses études pour parfaire cette technologie.

Les travaux montrés ici démontrent une utilisation potentielle d'autres types cellulaires que les cellules T pour la thérapie CAR. Les cellules NK, ont un rôle majeur dans la surveillance des cellules cancéreuses et un fort potentiel cytotoxique. Bien que ces cellules soient toutes désignées pour la thérapie CAR, leur utilisation a été limitée par les techniques de modification génétiques moins efficaces que sur les cellules T. Nous reportons donc que l'utilisation de l'enveloppe BaEV permet d'utiliser des vecteurs lentiviraux efficacement pour transduire les cellules NK. Nous avons démontré l'efficacité de cette méthode dans le contexte de la thérapie CAR même avec des constructions génétiques complexes comportant deux CAR.

Dans le même objectif de diversifier les possibilités d'utilisation de types cellulaires, nous avons démontré l'utilisation potentielle des HSC pour la thérapie CAR. Le renouvellement continu de cellules T exprimant le CAR permettrait de maintenir un effet anti-cancéreux à long terme. Nous avons développé un promoteur spécifique limitant l'expression aux seules cellules T, le PIRATE. Cette séquence en plus de limiter l'expression donne des niveaux d'expressions plus faibles qui vont permettre une cytotoxicité tout en limitant le signal tonique induit par le CAR. Notre approche est une preuve de concept de la faisabilité de la thérapie CAR par des HSC, mais elle démontre également l'importance de la régulation du transgène dans un contexte de développement cellulaire.

Ces deux nouvelles technologies aideront à développer l'utilisation des NK et des HSC avec les CAR. Nous avons démontré l'utilisation dans le cadre de la leucémie, mais l'adaptation de ces méthodes pour d'autres types de cancer et la suite logique de ces travaux. L'optimisation des constructions de CAR pour l'utilisation avec les NK ou les HSC pourrait permettre de cibler de

nouveaux cancer mais aussi d'optimiser les signaux dans ces cellules précisément. Il reste donc une longue route à parcourir pour ces approches d'immunothérapies et ces travaux n'en sont que le début.

Références bibliographiques

1. Hajdu SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 2. *Cancer*. 2011;117(12):2811-20.
2. Society CC. Canadian Cancer Statistics 2017. Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics 2017.
3. Canada S. Leading causes of death, total population, by age group.
4. Bhakta N, Force LM, Allemani C, Atun R, Bray F, Coleman MP, et al. Childhood cancer burden: a review of global estimates. *The Lancet Oncology*. 2019;20(1):e42-e53.
5. Moore MAS, editor *Marrow Culture—a New Approach to Classification of Leukemias. Unclassifiable Leukemias; 1975 1975//*; Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394-424.
7. Dusetzina SB. Drug Pricing Trends for Orally Administered Anticancer Medications Reimbursed by Commercial Health Plans, 2000-2014. *JAMA Oncol*. 2016;2(7):960-1.
8. Goldstein DA, Clark J, Tu Y, Zhang J, Fang F, Goldstein R, et al. A global comparison of the cost of patented cancer drugs in relation to global differences in wealth. *Oncotarget*. 2017;8(42):71548-55.
9. Gordon N, Stemmer SM, Greenberg D, Goldstein DA. Trajectories of Injectable Cancer Drug Costs After Launch in the United States. *J Clin Oncol*. 2018;36(4):319-25.
10. Pardue SF, Fenton MV, Rounds LR. The social impact of cancer. *Dimens Oncol Nurs*. 1989;3(1):5-13.
11. Compas BE, Worsham NL, Epping-Jordan JE, Grant KE, Mireault G, Howell DC, et al. When Mom or Dad has cancer: Markers of psychological distress in cancer patients, spouses, and children. Washington, DC, US: American Psychological Association; 1999. 291-307 p.

12. Ganz PA. Current issues in cancer rehabilitation. *Cancer*. 1990;65(3 Suppl):742-51.
13. Houts PS, Yasko JM, Kahn SB, Schelzel GW, Marconi KM. Unmet psychological, social, and economic needs of persons with cancer in Pennsylvania. *Cancer*. 1986;58(10):2355-61.
14. Chirikos TN, Russell-Jacobs A, Cantor AB. Indirect economic effects of long-term breast cancer survival. *Cancer Pract*. 2002;10(5):248-55.
15. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. 2011;469(7330):314-22.
16. Ron E. Ionizing Radiation and Cancer Risk: Evidence from Epidemiology. *Radiation Research*. 1998;150(5s):S30-S41.
17. Freifelder D. DNA Strand Breakage by X-Irradiation. *Radiation Research*. 1966;29(3):329-38.
18. Ravanat J-L, Douki T, Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001;63(1):88-102.
19. Parrish JA, Jaenicke KF, Anderson RR. Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem Photobiol*. 1982;36(2):187-91.
20. Whiteman D, Green A. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med*. 1999;341(10):766-7.
21. Bevan RJ, Harrison PTC. Threshold and non-threshold chemical carcinogens: A survey of the present regulatory landscape. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2017;88:291-302.
22. Frenkel K. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacology & Therapeutics*. 1992;53(1):127-66.
23. Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *The Lancet Oncology*. 2002;3(8):461-9.
24. Grimsrud TK, Berge SR, Haldorsen T, Andersen A. Exposure to Different Forms of Nickel and Risk of Lung Cancer. *American Journal of Epidemiology*. 2002;156(12):1123-32.
25. Barzilai A, Yamamoto K-I. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):1109-15.

26. Ratna A, Mandrekar P. Alcohol and Cancer: Mechanisms and Therapies. *Biomolecules*. 2017;7(3):61.
27. Organization WH. Global status report on alcohol and health 2018: World Health Organization; 2019.
28. Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, Urayama KY. Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer investigation*. 2005;23(1):60-75.
29. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(12):3812-5.
30. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet*. 1964;1(7335):702-3.
31. Moore PS, Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nature Reviews Cancer*. 2010;10(12):878-89.
32. Kikkawa U, Takai Y, Tanaka Y, Miyake R, Nishizuka Y. Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*. 1983;258(19):11442-5.
33. Pauklin S, Sernández IV, Bachmann G, Ramiro AR, Petersen-Mahrt SK. Estrogen directly activates AID transcription and function. *J Exp Med*. 2009;206(1):99-111.
34. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
35. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(5):2645-50.
36. Carter BZ, Mak PY, Wang X, Tao W, Ruvo V, Mak D, et al. An ARC-Regulated IL1 β /Cox-2/PGE2/ β -Catenin/ARC Circuit Controls Leukemia–Microenvironment Interactions and Confers Drug Resistance in AML. *Cancer Research*. 2019;79(6):1165-77.
37. Volpe JPG. Genetic instability of cancer: Why a metastatic tumor is unstable and a benign tumor is stable. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1988;34(1):125-34.
38. Aaltonen LA, Peltomäki P, Mecklin J-P, Järvinen H, Jass JR, Green JS, et al. Replication Errors in Benign and Malignant Tumors from Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Patients. *Cancer Research*. 1994;54(7):1645-8.

39. Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
40. Salven P, Lymboussaki A, Heikkilä P, Jääskela-Saari H, Enholm B, Aase K, et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol*. 1998;153(1):103-8.
41. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*. 2006;2(3):213-9.
42. Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2018;18(2):128-34.
43. Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019;20(11):698-714.
44. Frank KM, Sekiguchi JM, Seidl KJ, Swat W, Rathbun GA, Cheng H-L, et al. Late embryonic lethality and impaired V (D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature*. 1998;396(6707):173-7.
45. Guirouilh-Barbat J, Huck S, Bertrand P, Pirzio L, Desmaze C, Sabatier L, et al. Impact of the KU80 Pathway on NHEJ-Induced Genome Rearrangements in Mammalian Cells. *Molecular Cell*. 2004;14(5):611-23.
46. Sharma V, Collins LB, Chen T-H, Herr N, Takeda S, Sun W, et al. Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations. *Oncotarget*. 2016;7(18):25377-90.
47. Filippo JS, Sung P, Klein H. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annual Review of Biochemistry*. 2008;77(1):229-57.
48. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, et al. ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science*. 2007;316(5828):1160-6.
49. Zhou B-BS, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000;408(6811):433-9.
50. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. 2002;415(6867):45-53.

51. Chipuk JE, Green DR. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006;13(6):994-1002.
52. McClendon AK, Dean JL, Ertel A, Knudsen ES. Differential impact of tumor suppressor pathways on DNA damage response and therapy-induced transformation in a mouse primary cell model. *PLoS One.* 2010;5(1):e8558-e.
53. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(2):93-115.
54. Van Dyke T. p53 and Tumor Suppression. *New England Journal of Medicine.* 2007;356(1):79-81.
55. Jung H, Kim HS, Kim JY, Sun JM, Ahn JS, Ahn MJ, et al. DNA methylation loss promotes immune evasion of tumours with high mutation and copy number load. *Nat Commun.* 2019;10(1):4278.
56. Hodges TR, Ott M, Xiu J, Gatalica Z, Swensen J, Zhou S, et al. Mutational burden, immune checkpoint expression, and mismatch repair in glioma: implications for immune checkpoint immunotherapy. *Neuro-oncology.* 2017;19(8):1047-57.
57. Takeshima H, Ushijima T. Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. *npj Precision Oncology.* 2019;3(1):7.
58. Ponder BAJ. Cancer genetics. *Nature.* 2001;411(6835):336-41.
59. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature Genetics.* 2000;24(3):227-35.
60. Li J, Duncan DT, Zhang B. CanProVar: a human cancer proteome variation database. *Human Mutation.* 2010;31(3):219-28.
61. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *New England Journal of Medicine.* 2015;373(16):1541-52.
62. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet.* 2013;381(9881):1943-55.
63. Pui C-H, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2004;350(15):1535-48.

64. Richard-Carpentier G, Kantarjian H, Jabbour E. Recent Advances in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2019;14(2):106-18.
65. Roth DB. V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiol Spectr*. 2014;2(6):10.1128/microbiolspec.MDNA3-0041-2014.
66. Mijušković M, Chou Y-F, Gigi V, Lindsay CR, Shestova O, Lewis SM, et al. Off-Target V(D)J Recombination Drives Lymphomagenesis and Is Escalated by Loss of the Rag2 C Terminus. *Cell Rep*. 2015;12(11):1842-52.
67. Burmeister T, Molkenin M, Schwartz S, Gökbuget N, Hoelzer D, Thiel E, et al. Erroneous class switching and false VDJ recombination: molecular dissection of t(8;14)/MYC-IGH translocations in Burkitt-type lymphoblastic leukemia/B-cell lymphoma. *Mol Oncol*. 2013;7(4):850-8.
68. Larmonie NSD, Dik WA, Meijerink JPP, Homminga I, van Dongen JJM, Langerak AW. Breakpoint sites disclose the role of the V(D)J recombination machinery in the formation of T-cell receptor (TCR) and non-TCR associated aberrations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(8):1173-84.
69. Pérez-Vera P, Montero-Ruiz O, Frías S, Ulloa-Avilés V, Cárdenas-Cardós R, Paredes-Aguilera R, et al. Detection of ETV6 and RUNX1 gene rearrangements using fluorescence in situ hybridization in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia: experience at a single institution. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2005;162(2):140-5.
70. Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H, et al. Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med*. 1993;329(13):909-14.
71. Croce CM, Huebner K, Isobe M, Fainstain E, Lifshitz B, Shtivelman E, et al. Mapping of four distinct BCR-related loci to chromosome region 22q11: order of BCR loci relative to chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia breakpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(20):7174-8.
72. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*. 2017;7(6):e577-e.
73. Jordan MA, Himes RH, Wilson L. Comparison of the effects of vinblastine, vincristine, vindesine, and vinepidine on microtubule dynamics and cell proliferation in vitro. *Cancer research*. 1985;45(6):2741-7.

74. Sarris AH, Hagemeister F, Romaguera J, Rodriguez MA, McLaughlin P, Tsimberidou AM, et al. Liposomal vincristine in relapsed non-Hodgkin's lymphomas: early results of an ongoing phase II trial. *Ann Oncol*. 2000;11(1):69-72.
75. Duval M, Suciu S, Ferster A, Rialland X, Nelken B, Lutz P, et al. Comparison of Escherichia coli-asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood*. 2002;99(8):2734-9.
76. Broome JD. L-Asparaginase: discovery and development as a tumor-inhibitory agent. *Cancer Treat Rep*. 1981;65 Suppl 4:111-4.
77. Yaqub F. Mechanism of action of anthracycline drugs. *The Lancet Oncology*. 2013;14(8):e296.
78. Rivera GK, Evans WE, Kalwinsky DK, Mirro J, Ochs J, Dow LW, et al. Unexpectedly severe toxicity from intensive early treatment of childhood lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 1985;3(2):201-6.
79. Nurgali K, Jagoe RT, Abalo R. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9(245).
80. Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med*. 1991;324(12):808-15.
81. Meadows AT, Evans AE. Effects of chemotherapy on the central nervous system—A study of parenteral methotrexate in long-term survivors of leukemia and lymphoma in childhood. *Cancer*. 1976;37(S2):1079-85.
82. MEIROW D, BIEDERMAN H, ANDERSON RA, WALLACE WHB. Toxicity of Chemotherapy and Radiation on Female Reproduction. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2010;53(4):727-39.
83. Pont J, Albrecht W. Fertility after chemotherapy for testicular germ cell cancer. *Fertility and Sterility*. 1997;68(1):1-5.
84. Neglia JP, Meadows AT, Robison LL, Kim TH, Newton WA, Ruymann FB, et al. Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med*. 1991;325(19):1330-6.
85. Penn I. Second neoplasms following radiotherapy or chemotherapy for cancer. *Am J Clin Oncol*. 1982;5(1):83-96.

86. Hawkins MM, Wilson LM, Stovall MA, Marsden HB, Potok MH, Kingston JE, et al. Epipodophyllotoxins, alkylating agents, and radiation and risk of secondary leukaemia after childhood cancer. *BMJ*. 1992;304(6832):951-8.
87. Leiper AD, Grant DB, Chessells JM. The effect of testicular irradiation on Leydig cell function in prepubertal boys with acute lymphoblastic leukaemia. *Arch Dis Child*. 1983;58(11):906-10.
88. Barbour RS, Porter MA, Peddie VL, Bhattacharya S. Counselling in the context of fertility and cancer: Some sociological insights. *Human Fertility*. 2013;16(1):54-8.
89. Petyim S, Neungton C, Thanaboonyawat I, Laokirkkiat P, Choavaratana R. Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(12):1673-80.
90. Nangia AK, Krieg SA, Kim SS. Clinical guidelines for sperm cryopreservation in cancer patients. *Fertility and Sterility*. 2013;100(5):1203-9.
91. Cruz MRS, Prestes JC, Gimenes DL, Fanelli MF. Fertility preservation in women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy: a systematic review. *Fertility and Sterility*. 2010;94(1):138-43.
92. Recchia F, Saggio G, Amiconi G, Blasio AD, Cesta A, Candeloro G, et al. Gonadotropin-releasing hormone analogues added to adjuvant chemotherapy protect ovarian function and improve clinical outcomes in young women with early breast carcinoma. *Cancer*. 2006;106(3):514-23.
93. Pacey AA. Fertility issues in survivors from adolescent cancers. *Cancer Treat Rev*. 2007;33(7):646-55.
94. Danilova N. The evolution of immune mechanisms. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2006;306B(6):496-520.
95. Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2017;8:1124-.
96. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Reviews Immunology*. 2001;1(1):41-9.

97. Gidlund M, Orn A, Wigzell H, Senik A, Gresser I. Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature*. 1978;273(5665):759-61.
98. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death & Differentiation*. 2008;15(2):226-33.
99. Cooper MA, Colonna M, Yokoyama WM. Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO reports*. 2009;10(10):1103-10.
100. Rosenberg J, Huang J. CD8(+) T Cells and NK Cells: Parallel and Complementary Soldiers of Immunotherapy. *Curr Opin Chem Eng*. 2018;19:9-20.
101. Male V, Nisoli I, Kostrzewski T, Allan DSJ, Carlyle JR, Lord GM, et al. The transcription factor E4bp4/Nfil3 controls commitment to the NK lineage and directly regulates Eomes and Id2 expression. *J Exp Med*. 2014;211(4):635-42.
102. Boos MD, Yokota Y, Eberl G, Kee BL. Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J Exp Med*. 2007;204(5):1119-30.
103. Meazza R, Azzarone B, Orengo AM, Ferrini S. Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: perspectives for immunotherapy. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:861920-.
104. Zhang Q, Nowak I, Vonderheid EC, Rook AH, Kadin ME, Nowell PC, et al. Activation of Jak/STAT proteins involved in signal transduction pathway mediated by receptor for interleukin 2 in malignant T lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(17):9148-53.
105. Brown S, Hu N, Hombría JC-G. Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Current Biology*. 2001;11(21):1700-5.
106. Bonanno G, Mariotti A, Procoli A, Corallo M, Scambia G, Pierelli L, et al. Interleukin-21 induces the differentiation of human umbilical cord blood CD34-lineage- cells into pseudomature lytic NK cells. *BMC Immunol*. 2009;10:46-.
107. Sitnicka E. Early Cellular Pathways of Mouse Natural Killer Cell Development. *Journal of Innate Immunity*. 2011;3(4):329-36.
108. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*. 1989;169(6):2233-8.

109. Huntington ND, Legrand N, Alves NL, Jaron B, Weijer K, Plet A, et al. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med*. 2008;206(1):25-34.
110. Aguado E, Santamaría M, Gallego MD, Peña J, Molina IJ. Functional expression of CD43 on human natural killer cells. *J Leukoc Biol*. 1999;66(6):923-9.
111. Fu B, Wang F, Sun R, Ling B, Tian Z, Wei H. CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology*. 2011;133(3):350-9.
112. Ouyang Q, Baerlocher G, Vulto I, Lansdorp PM. Telomere length in human natural killer cell subsets. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1106:240-52.
113. Chan A, Hong D-L, Atzberger A, Kollnberger S, Filer AD, Buckley CD, et al. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol*. 2007;179(1):89-94.
114. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol*. 1989;143(10):3183-91.
115. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461-9.
116. Keskin DB, Allan DSJ, Rybalov B, Andzelm MM, Stern JNH, Kopcow HD, et al. TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3378-83.
117. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:227-58.
118. Bhatnagar N, Ahmad F, Hong HS, Eberhard J, Lu I-N, Ballmaier M, et al. FcγRIII (CD16)-mediated ADCC by NK cells is regulated by monocytes and FcγRII (CD32). *European Journal of Immunology*. 2014;44(11):3368-79.
119. Mandelboim O, Malik P, Davis DM, Jo CH, Boyson JE, Strominger JL. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(10):5640-4.
120. Lanier LL, Yu G, Phillips JH. Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature*. 1989;342(6251):803-5.

121. Li Y, Mariuzza RA. Structural basis for recognition of cellular and viral ligands by NK cell receptors. *Front Immunol*. 2014;5:123-.
122. Barrow AD, Martin CJ, Colonna M. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol*. 2019;10:909-.
123. Byrd A, Hoffmann SC, Jarahian M, Momburg F, Watzl C. Expression Analysis of the Ligands for the Natural Killer Cell Receptors NKp30 and NKp44. *PLoS One*. 2007;2(12):e1339.
124. Augugliaro R, Parolini S, Castriconi R, Marcenaro E, Cantoni C, Nanni M, et al. Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells. *European journal of immunology*. 2003;33(5):1235-41.
125. Campbell KS, Yusa S-i, Kikuchi-Maki A, Catina TL. NKp44 triggers NK cell activation through DAP12 association that is not influenced by a putative cytoplasmic inhibitory sequence. *J Immunol*. 2004;172(2):899-906.
126. Smith KM, Wu J, Bakker ABH, Phillips JH, Lanier LL. Cutting Edge: Ly-49D and Ly-49H Associate with Mouse DAP12 and Form Activating Receptors. *The Journal of Immunology*. 1998;161(1):7-10.
127. Lanier LL, Phillips JH. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunology Today*. 1996;17(2):86-91.
128. Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science (New York, NY)*. 2000;288(5473):2051-4.
129. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998;391(6669):795-9.
130. Yusa S-i, Catina TL, Campbell KS. SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells. *J Immunol*. 2002;168(10):5047-57.
131. Frazier WR, Steiner N, Hou L, Dakshanamurthy S, Hurley CK. Allelic variation in KIR2DL3 generates a KIR2DL2-like receptor with increased binding to its HLA-C ligand. *J Immunol*. 2013;190(12):6198-208.
132. Littera R, Piredda G, Argiolas D, Lai S, Congeddu E, Ragatzu P, et al. KIR and their HLA Class I ligands: Two more pieces towards completing the puzzle of chronic rejection and graft loss in kidney transplantation. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180831-e.

133. Béziat V, Hilton HG, Norman PJ, Traherne JA. Deciphering the killer-cell immunoglobulin-like receptor system at super-resolution for natural killer and T-cell biology. *Immunology*. 2017;150(3):248-64.
134. Carrillo-Bustamante P, Keşmir C, de Boer RJ. The evolution of natural killer cell receptors. *Immunogenetics*. 2016;68(1):3-18.
135. Denis L, Sivula J, Gourraud PA, Kerdudou N, Chout R, Ricard C, et al. Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Réunion. *Tissue Antigens*. 2005;66(4):267-76.
136. Cheent KS, Jamil KM, Cassidy S, Liu M, Mbiribindi B, Mulder A, et al. Synergistic inhibition of natural killer cells by the nonsignaling molecule CD94. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(42):16981-6.
137. Landis RC, McDowall A, Holness CL, Littler AJ, Simmons DL, Hogg N. Involvement of the "I" domain of LFA-1 in selective binding to ligands ICAM-1 and ICAM-3. *J Cell Biol*. 1994;126(2):529-37.
138. Enqvist M, Ask EH, Forslund E, Carlsten M, Abrahamsen G, Béziat V, et al. Coordinated Expression of DNAM-1 and LFA-1 in Educated NK Cells. *The Journal of Immunology*. 2015;194(9):4518-27.
139. Barber DF, Faure M, Long EO. LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J Immunol*. 2004;173(6):3653-9.
140. Carisey AF, Mace EM, Saeed MB, Davis DM, Orange JS. Nanoscale Dynamism of Actin Enables Secretory Function in Cytolytic Cells. *Curr Biol*. 2018;28(4):489-502.e9.
141. Banerjee PP, Pandey R, Zheng R, Suhoski MM, Monaco-Shawver L, Orange JS. Cdc42-interacting protein-4 functionally links actin and microtubule networks at the cytolytic NK cell immunological synapse. *J Exp Med*. 2007;204(10):2305-20.
142. Rak GD, Mace EM, Banerjee PP, Svitkina T, Orange JS. Natural killer cell lytic granule secretion occurs through a pervasive actin network at the immune synapse. *PLoS Biol*. 2011;9(9):e1001151-e.
143. Iizuka Y, Cichocki F, Sieben A, Sforza F, Karim R, Coughlin K, et al. UNC-45A Is a Nonmuscle Myosin IIA Chaperone Required for NK Cell Cytotoxicity via Control of Lytic Granule Secretion. *J Immunol*. 2015;195(10):4760-70.

144. Podack ER, Young JD, Cohn ZA. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82(24):8629-33.
145. Voskoboinik I, Thia M-C, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smyth MJ, et al. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem*. 2005;280(9):8426-34.
146. Goping IS, Barry M, Liston P, Sawchuk T, Constantinescu G, Michalak KM, et al. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity*. 2003;18(3):355-65.
147. Loetscher H, Pan Y-CE, Lahm H-W, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, et al. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1990;61(2):351-9.
148. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science (New York, NY)*. 1997;277(5327):815-8.
149. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science (New York, NY)*. 1997;276(5309):111-3.
150. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, et al. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science (New York, NY)*. 1996;274(5289):990-2.
151. Pan G, Bauer JH, Haridas V, Wang S, Liu D, Yu G, et al. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett*. 1998;431(3):351-6.
152. Schwandner R, Wiegmann K, Bernardo K, Kreder D, Kronke M. TNF receptor death domain-associated proteins TRADD and FADD signal activation of acid sphingomyelinase. *J Biol Chem*. 1998;273(10):5916-22.
153. Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, et al. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol*. 2000;2(4):241-3.
154. Baarcenai A, Muench MO, Roncarolo MG, Spits H. Tracing the Expression of CD7 and other Antigens during T- and Myeloid-cell Differentiation in the Human Fetal Liver and Thymus. *Leukemia & Lymphoma*. 1995;17(1-2):1-11.

155. Res P, Blom B, Hori T, Weijer K, Spits H. Downregulation of CD1 Marks Acquisition of Functional Maturation of Human Thymocytes and Defines a Control Point in Late Stages of Human T Cell Development. *J Exp Med*. 1997;185(1):141-52.
156. Chen ELY, Thompson PK, Zúñiga-Pflücker JC. RBPJ-dependent Notch signaling initiates the T cell program in a subset of thymus-seeding progenitors. *Nature Immunology*. 2019;20(11):1456-68.
157. Scripture-Adams DD, Damle SS, Li L, Elihu KJ, Qin S, Arias AM, et al. GATA-3 Dose-Dependent Checkpoints in Early T Cell Commitment. *The Journal of Immunology*. 2014;193(7):3470-91.
158. Zhou X, Yu S, Zhao D-M, Harty JT, Badovinac VP, Xue H-H. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity*. 2010;33(2):229-40.
159. Petrie HT. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(11):859-66.
160. Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nature Genetics*. 2001;27(3):286-91.
161. Protin U, Schweighoffer T, Jochum W, Hilberg F. CD44-Deficient Mice Develop Normally with Changes in Subpopulations and Recirculation of Lymphocyte Subsets. *The Journal of Immunology*. 1999;163(9):4917-23.
162. de la Hera A, Acevedo A, Marston W, Sanchez-Madrid F. Function of CD44(Pgp-1) homing receptor in human T cell precursors. *International Immunology*. 1989;1(6):598-604.
163. Pearse M, Wu L, Egerton M, Wilson A, Shortman K, Scollay R. A murine early thymocyte developmental sequence is marked by transient expression of the interleukin 2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989;86(5):1614-8.
164. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 2018;36:411-33.
165. Hoffman ES, Passoni L, Crompton T, Leu TM, Schatz DG, Koff A, et al. Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. *Genes Dev*. 1996;10(8):948-62.

166. Yannoutsos N, Wilson P, Yu W, Chen HT, Nussenzweig A, Petrie H, et al. The Role of Recombination Activating Gene (RAG) Reinduction in Thymocyte Development in Vivo. *J Exp Med*. 2001;194(4):471-80.
167. Brändle D, Müller C, Rülcke T, Hengartner H, Pircher H. Engagement of the T-cell receptor during positive selection in the thymus down-regulates RAG-1 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(20):9529-33.
168. Market E, Papavasiliou FN. V(D)J Recombination and the Evolution of the Adaptive Immune System. *PLoS Biol*. 2003;1(1):e16.
169. Hernandez JB, Newton RH, Walsh CM. Life and death in the thymus--cell death signaling during T cell development. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(6):865-71.
170. Singer A, Bosselut R, Bhandoola A. Signals involved in CD4/CD8 lineage commitment: Current concepts and potential mechanisms. *Semin Immunol*. 1999;11(4):273-81.
171. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nature immunology*. 2003;4(4):350-4.
172. Punt JA, Havran W, Abe R, Sarin A, Singer A. T cell receptor (TCR)-induced death of immature CD4+CD8+ thymocytes by two distinct mechanisms differing in their requirement for CD28 costimulation: implications for negative selection in the thymus. *J Exp Med*. 1997;186(11):1911-22.
173. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:139-76.
174. Vrisekoop N, Monteiro JP, Mandl JN, Germain RN. Revisiting thymic positive selection and the mature T cell repertoire for antigen. *Immunity*. 2014;41(2):181-90.
175. Harrington LE. 8 - T-Cell Development. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM, editors. *Clinical Immunology (Fifth Edition)*. London: Content Repository Only!; 2019. p. 119-25.e1.
176. Bowerman NA, Crofts TS, Chlewicki L, Do P, Baker BM, Christopher Garcia K, et al. Engineering the binding properties of the T cell receptor:peptide:MHC ternary complex that governs T cell activity. *Mol Immunol*. 2009;46(15):3000-8.

177. Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa K, Takamatsu M, Hashimoto-Tane A, Dustin ML, et al. Spatiotemporal Regulation of T Cell Costimulation by TCR-CD28 Microclusters and Protein Kinase C θ Translocation. *Immunity*. 2008;29(4):589-601.
178. Lysechko TL, Ostergaard HL. Differential Src Family Kinase Activity Requirements for CD3 ζ Phosphorylation/ZAP70 Recruitment and CD3 ϵ Phosphorylation. *The Journal of Immunology*. 2005;174(12):7807-14.
179. Boncristiano M, Majolini MB, D'Elios MM, Pacini S, Valensin S, Ulivieri C, et al. Defective recruitment and activation of ZAP-70 in common variable immunodeficiency patients with T cell defects. *European Journal of Immunology*. 2000;30(9):2632-8.
180. Denny MF, Patai B, Straus DB. Differential T-Cell Antigen Receptor Signaling Mediated by the Src Family Kinases Lck and Fyn. *Molecular and Cellular Biology*. 2000;20(4):1426-35.
181. Kim PW, Sun Z-YJ, Blacklow SC, Wagner G, Eck MJ. A Zinc Clasp Structure Tethers Lck to T Cell Coreceptors CD4 and CD8. *Science*. 2003;301(5640):1725-8.
182. Artyomov MN, Lis M, Devadas S, Davis MM, Chakraborty AK. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(39):16916-21.
183. König R, Huang LY, Germain RN. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature*. 1992;356(6372):796-8.
184. Devine L, Thakral D, Nag S, Dobbins J, Hodsdon ME, Kavathas PB. Mapping the Binding Site on CD8 β for MHC Class I Reveals Mutants with Enhanced Binding. *The Journal of Immunology*. 2006;177(6):3930-8.
185. Boesteanu AC, Katsikis PD. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. *Semin Immunol*. 2009;21(2):69-77.
186. Fu G, Chen Y, Schuman J, Wang D, Wen R. Phospholipase $\text{C}\gamma 2$ plays a role in TCR signal transduction and T cell selection. *J Immunol*. 2012;189(5):2326-32.
187. Shiroo M, Goff L, Biffen M, Shivnan E, Alexander D. CD45 tyrosine phosphatase-activated p59fyn couples the T cell antigen receptor to pathways of diacylglycerol production, protein kinase C activation and calcium influx. *The EMBO journal*. 1992;11(13):4887-97.
188. Feske S, Giltzane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nature Immunology*. 2001;2(4):316-24.

189. Sieh M, Batzer A, Schlessinger J, Weiss A. GRB2 and phospholipase C-gamma 1 associate with a 36- to 38-kilodalton phosphotyrosine protein after T-cell receptor stimulation. *Molecular and Cellular Biology*. 1994;14(7):4435-42.
190. Adachi K, Davis MM. T-cell receptor ligation induces distinct signaling pathways in naive vs. antigen-experienced T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(4):1549-54.
191. Kannan Y, Wilson MS. TEC and MAPK Kinase Signalling Pathways in T helper (T(H)) cell Development, T(H)2 Differentiation and Allergic Asthma. *J Clin Cell Immunol*. 2012;Suppl 12:11-.
192. Cheng J, Montecalvo A, Kane LP. Regulation of NF- κ B induction by TCR/CD28. *Immunol Res*. 2011;50(2-3):113-7.
193. Shin S-Y, Kim M-W, Cho K-H, Nguyen LK. Coupled feedback regulation of nuclear factor of activated T-cells (NFAT) modulates activation-induced cell death of T cells. *Scientific Reports*. 2019;9(1):10637.
194. Maurice NJ, McElrath MJ, Andersen-Nissen E, Frahm N, Prlic M. CXCR3 enables recruitment and site-specific bystander activation of memory CD8⁺ T cells. *Nature Communications*. 2019;10(1):4987.
195. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine*. 2009;15(8):914-20.
196. Singer A, Hodes RJ. Mechanisms of T cell-B cell interaction. *Annu Rev Immunol*. 1983;1(1):211-41.
197. Kudo-Saito C. Cancer-associated mesenchymal stem cells aggravate tumor progression. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3(23).
198. Gastl GA, Abrams JS, Nanus DM, Oosterkamp R, Silver J, Liu F, et al. Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *Int J Cancer*. 1993;55(1):96-101.
199. Vicari AP, Caux C, Trinchieri G. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Seminars in Cancer Biology*. 2002;12(1):33-42.
200. Selleri S, Bifsha P, Civini S, Pacelli C, Dieng MM, Lemieux W, et al. Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming. *Oncotarget*. 2016;7(21):30193-210.

201. Sitkovsky MV, Kjaergaard J, Lukashev D, Ohta A. Hypoxia-Adenosinergic Immunosuppression: Tumor Protection by T Regulatory Cells and Cancerous Tissue Hypoxia. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(19):5947-52.
202. Das S, Ariizumi K, Cruz PD, Jr. T-cell inhibitors: a bench-to-bedside review. *Dermatitis*. 2012;23(5):195-202.
203. Wang J, Okazaki I-m, Yoshida T, Chikuma S, Kato Y, Nakaki F, et al. PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. *International Immunology*. 2010;22(6):443-52.
204. Verma N, Burns SO, Walker LSK, Sansom DM. Immune deficiency and autoimmunity in patients with CTLA-4 (CD152) mutations. *Clin Exp Immunol*. 2017;190(1):1-7.
205. Odorizzi PM, Wherry EJ. Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections. *J Immunol*. 2012;188(7):2957-65.
206. Sheppard K-A, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 ζ signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett*. 2004;574(1-3):37-41.
207. Bardhan K, Patsoukis N, Weaver J, Freeman G, Li L, Boussiotis VA. PD-1 inhibits the TCR signaling cascade by sequestering SHP-2 phosphatase, preventing its translocation to lipid rafts and facilitating Csk-mediated inhibitory phosphorylation of Lck. *The Journal of Immunology*. 2016;196(1 Supplement):128.15-.15.
208. Guntermann C, Alexander DR. CTLA-4 Suppresses Proximal TCR Signaling in Resting Human CD4⁺ T Cells by Inhibiting ZAP-70 Tyr³¹⁹ Phosphorylation: A Potential Role for Tyrosine Phosphatases. *The Journal of Immunology*. 2002;168(9):4420-9.
209. Holt MP, Punkosdy GA, Glass DD, Shevach EM. TCR Signaling and CD28/CTLA-4 Signaling Cooperatively Modulate T Regulatory Cell Homeostasis. *J Immunol*. 2017;198(4):1503-11.
210. Zhou G, Levitsky HI. Natural Regulatory T Cells and De Novo-Induced Regulatory T Cells Contribute Independently to Tumor-Specific Tolerance. *The Journal of Immunology*. 2007;178(4):2155-62.
211. Govindaraj C, Scalzo-Inguanti K, Madondo M, Hallo J, Flanagan K, Quinn M, et al. Impaired Th1 immunity in ovarian cancer patients is mediated by TNFR2⁺ Tregs within the tumor microenvironment. *Clinical Immunology*. 2013;149(1):97-110.

212. Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*. 1998;396(6712):699-703.
213. Leonard BC, Johnson DE. Signaling by cell surface death receptors: Alterations in head and neck cancer. *Adv Biol Regul*. 2018;67:170-8.
214. Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(12):924-35.
215. Korolev KS, Xavier JB, Gore J. Turning ecology and evolution against cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2014;14(5):371-80.
216. Connor ME, Stern PL. Loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas. *Int J Cancer*. 1990;46(6):1029-34.
217. Madjd Z, Spendlove I, Pinder SE, Ellis IO, Durrant LG. Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer. *Int J Cancer*. 2005;117(2):248-55.
218. Watson NFS, Ramage JM, Madjd Z, Spendlove I, Ellis IO, Scholefield JH, et al. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer*. 2006;118(1):6-10.
219. Kim DT, Rothbard JB, Bloom DD, Fathman CG. Quantitative analysis of T cell activation: role of TCR/ligand density and TCR affinity. *J Immunol*. 1996;156(8):2737-42.
220. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunology today*. 1993;14(10):491-9.
221. Pantel K, Schlimok G, Kutter D, Schaller G, Genz T, Wiebecke B, et al. Frequent Down-Regulation of Major Histocompatibility Class I Antigen Expression on Individual Micrometastatic Carcinoma Cells. *Cancer Research*. 1991;51(17):4712-5.
222. Paulson KG, Tegeder A, Willmes C, Iyer JG, Afanasiev OK, Schrama D, et al. Downregulation of MHC-I Expression Is Prevalent but Reversible in Merkel Cell Carcinoma. *Cancer Immunology Research*. 2014;2(11):1071-9.
223. Placke T, Örgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee H-G, Kopp H-G, et al. Platelet-Derived MHC Class I Confers a Pseudonormal Phenotype to Cancer Cells That Subverts the Antitumor Reactivity of Natural Killer Immune Cells. *Cancer Research*. 2012;72(2):440-8.

224. Seliger B, Jasinski-Bergner S, Quandt D, Stoehr C, Bukur J, Wach S, et al. HLA-E expression and its clinical relevance in human renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(41):67360-72.
225. Ghadially H, Brown L, Lloyd C, Lewis L, Lewis A, Dillon J, et al. MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue. *Br J Cancer*. 2017;116(9):1208-17.
226. Schmiedel D, Mandelboim O. NKG2D Ligands-Critical Targets for Cancer Immune Escape and Therapy. *Front Immunol*. 2018;9:2040-.
227. Schlecker E, Fiegler N, Arnold A, Altevogt P, Rose-John S, Moldenhauer G, et al. Metalloprotease-mediated tumor cell shedding of B7-H6, the ligand of the natural killer cell-activating receptor NKp30. *Cancer research*. 2014;74(13):3429-40.
228. Wang W, Guo H, Geng J, Zheng X, Wei H, Sun R, et al. Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack. *J Biol Chem*. 2014;289(48):33311-9.
229. Castriconi R, Dondero A, Bellora F, Moretta L, Castellano A, Locatelli F, et al. Neuroblastoma-derived TGF- β 1 modulates the chemokine receptor repertoire of human resting NK cells. *J Immunol*. 2013;190(10):5321-8.
230. Urosevic M, Dummer R. HLA-G and IL-10 expression in human cancer—different stories with the same message. *Seminars in Cancer Biology*. 2003;13(5):337-42.
231. Wang G, Cao K, Liu K, Xue Y, Roberts AI, Li F, et al. Kynurenic acid, an IDO metabolite, controls TSG-6-mediated immunosuppression of human mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation*. 2018;25(7):1209-23.
232. Henze A-T, Mazzone M. The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(10):3672-9.
233. Raggi F, Pelassa S, Pierobon D, Penco F, Gattorno M, Novelli F, et al. Regulation of Human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1. *Front Immunol*. 2017;8:1097-.
234. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1801.
235. Fuertes Marraco SA, Neubert NJ, Verdeil G, Speiser DE. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front Immunol*. 2015;6(310).

236. Legat A, Speiser D, Pircher H, Zehn D, Fuertes Marraco S. Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than “Exhaustion” of Human CD8 T Cells. *Front Immunol*. 2013;4(455).
237. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12293-7.
238. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *The Journal of Immunology*. 2004;173(2):945-54.
239. Sheppard K-A, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett*. 2004;574(1-3):37-41.
240. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*. 1995;3(1):87-98.
241. Patsoukis N, Li L, Sari D, Petkova V, Boussiotis VA. PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2. *Molecular and cellular biology*. 2013;33(16):3091-8.
242. Patsoukis N, Brown J, Petkova V, Liu F, Li L, Boussiotis VA. Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci Signal*. 2012;5(230):ra46-ra.
243. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995;182(2):459-65.
244. Hannier S, Tournier M, Bismuth G, Triebel F. CD3/TCR Complex-Associated Lymphocyte Activation Gene-3 Molecules Inhibit CD3/TCR Signaling. *The Journal of Immunology*. 1998;161(8):4058-65.
245. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*. 2002;415(6871):536-41.
246. Garni-Wagner BA, Purohit A, Mathew PA, Bennett M, Kumar V. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *The Journal of Immunology*. 1993;151(1):60-70.

247. Xiao H, Woods EC, Vukojcic P, Bertozzi CR. Precision glyocalyx editing as a strategy for cancer immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(37):10304-9.
248. Hudak JE, Canham SM, Bertozzi CR. Glyocalyx engineering reveals a Siglec-based mechanism for NK cell immunoevasion. *Nature Chemical Biology*. 2014;10(1):69-75.
249. Díaz LR, Saavedra-López E, Romarate L, Mitxitorena I, Casanova PV, Cribaro GP, et al. Imbalance of immunological synapse-kinapse states reflects tumor escape to immunity in glioblastoma. *JCI Insight*. 2018;3(18):e120757.
250. Wurzer H, Hoffmann C, Al Absi A, Thomas C. Actin Cytoskeleton Straddling the Immunological Synapse between Cytotoxic Lymphocytes and Cancer Cells. *Cells*. 2019;8(5):463.
251. Gubbels JAA, Felder M, Horibata S, Belisle JA, Kapur A, Holden H, et al. MUC16 provides immune protection by inhibiting synapse formation between NK and ovarian tumor cells. *Mol Cancer*. 2010;9:11-.
252. OSGOOD EE, RIDDLE MC, MATHEWS TJ. APLASTIC ANEMIA TREATED WITH DAILY TRANSFUSIONS AND INTRAVENOUS MARROW; CASE REPORT*. *Annals of Internal Medicine*. 1939;13(2):357-67.
253. Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Med J*. 2014;5(4):e0028-e.
254. Negrin RS. Graft-versus-host disease versus graft-versus-leukemia. *Hematology*. 2015;2015(1):225-30.
255. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957;257(11):491-6.
256. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 2014;124(3):344-53.
257. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(12):1628-33.
258. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science (New York, NY)*. 2002;295(5562):2097-100.

259. Ohlen C, Kling G, Hoglund P, Hansson M, Scangos G, Bieberich C, et al. Prevention of allogeneic bone marrow graft rejection by H-2 transgene in donor mice. *Science*. 1989;246(4930):666-8.
260. Moretta A, Pende D, Locatelli F, Moretta L. Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukaemias. *Clin Exp Immunol*. 2009;157(3):325-31.
261. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Age, thymopoiesis, and CD4⁺ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med*. 1995;332(3):143-9.
262. Moutouou MM, Pagé G, Zaid I, Lesage S, Guimond M. Restoring T Cell Homeostasis After Allogeneic Stem Cell Transplantation; Principal Limitations and Future Challenges. *Front Immunol*. 2018;9:1237-.
263. Inoue H, Yasuda Y, Hattori K, Shimizu T, Matsumoto M, Yabe M, et al. The Kinetics of Immune Reconstitution after Cord Blood Transplantation and Selected cd34⁺ Stem Cell Transplantation in Children: Comparison with Bone Marrow Transplantation. *International Journal of Hematology*. 2003;77(4):399-407.
264. Lilleri D, Fornara C, Chiesa A, Caldera D, Alessandrino EP, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica*. 2008;93(2):248-56.
265. Ruutu T, Niederwieser D, Gratwohl A, Apperley JF. A survey of the prophylaxis and treatment of acute GVHD in Europe: a report of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplantation*. 1997;19(8):759-64.
266. Morecki S, Yacovlev E, Gelfand Y, Shabat Y, Slavin S. Induction of Graft-versus-Leukemia (GVL) Effect without Graft-versus-Host Disease (GVHD) by Pretransplant Donor Treatment with Immunomodulators. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2009;15(4):406-15.
267. Chakraverty R, Eom H-S, Sachs J, Buchli J, Cotter P, Hsu R, et al. Host MHC class II⁺ antigen-presenting cells and CD4 cells are required for CD8-mediated graft-versus-leukemia responses following delayed donor leukocyte infusions. *Blood*. 2006;108(6):2106-13.
268. Matte CC, Liu J, Cormier J, Anderson BE, Athanasiadis I, Jain D, et al. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nature Medicine*. 2004;10(9):987-92.

269. Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, et al. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010;115(15):3158-61.
270. Bortin MM, Truitt RL, Rimm AA, Bach FH. Graft-versus-leukaemia reactivity induced by alloimmunisation without augmentation of graft-versus-host reactivity. *Nature*. 1979;281(5731):490-1.
271. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science (New York, NY)*. 1999;285(5426):412-5.
272. Lin CM, Gill RG. Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms. *Current opinion in organ transplantation*. 2016;21(1):40-4.
273. Horowitz M, Schreiber H, Elder A, Heidenreich O, Vormoor J, Toffalori C, et al. Epidemiology and biology of relapse after stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2018;53(11):1379-89.
274. Lennard AL, Jackson GH. Stem cell transplantation. *BMJ*. 2000;321(7258):433-7.
275. Hatzimichael E, Tuthill M. Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Cloning*. 2010;3:105-17.
276. Smith AR, Wagner JE. Alternative haematopoietic stem cell sources for transplantation: place of umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2009;147(2):246-61.
277. Alblooshi RM, Deotare U, Michelis FV, Thyagu S, Kim D, Lipton JH, et al. My jamais vu in post allogeneic hematopoietic cell transplant: a review on secondary hemophagocytosis in adults. *Bone Marrow Transplantation*. 2019.
278. Michallet M, Archimbaud E, Bandini G, Rowlings PA, Deeg HJ, Gahrton G, et al. HLA-identical sibling bone marrow transplantation in younger patients with chronic lymphocytic leukemia. European Group for Blood and Marrow Transplantation and the International Bone Marrow Transplant Registry. *Annals of internal medicine*. 1996;124(3):311-5.
279. Hings IM, Severson R, Filipovich AH, Blazar BR, Kersey JH, Ramsay NK, et al. Treatment of moderate and severe acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation*. 1994;58(4):437-42.

280. Sun K, Welniak LA, Panoskaltsis-Mortari A, O'Shaughnessy MJ, Liu H, Barao I, et al. Inhibition of acute graft-versus-host disease with retention of graft-versus-tumor effects by the proteasome inhibitor bortezomib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(21):8120-5.
281. Murray J, Stringer J, Hutt D. Graft-Versus-Host Disease (GvHD). In: Kenyon M, Babic A, editors. *The European Blood and Marrow Transplantation Textbook for Nurses: Under the Auspices of EBMT*. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 221-51.
282. Razonable RR, Emery VC, th Annual Meeting of the I. Management of CMV infection and disease in transplant patients. 27-29 February 2004. *Herpes*. 2004;11(3):77-86.
283. Jaskula E, Bochenska J, Kocwin E, Tarnowska A, Lange A. CMV Serostatus of Donor-Recipient Pairs Influences the Risk of CMV Infection/Reactivation in HSCT Patients. *Bone Marrow Research*. 2012;2012:8.
284. Steinmann J, Hamprecht A, Vehreschild MJGT, Cornely OA, Buchheidt D, Spiess B, et al. Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(5):1522-6.
285. Quesada JR, Rios A, Swanson D, Trown P, Gutterman JU. Antitumor activity of recombinant-derived interferon alpha in metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 1985;3(11):1522-8.
286. Gresser I, Bourali C. Antitumor effects of interferon preparations in mice. *J Natl Cancer Inst*. 1970;45(2):365-76.
287. Constantinescu SN, Croze E, Wang C, Murti A, Basu L, Mullersman JE, et al. Role of interferon alpha/beta receptor chain 1 in the structure and transmembrane signaling of the interferon alpha/beta receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(20):9602-6.
288. Darnell JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994;264(5164):1415-21.
289. Majewski S, Szmurlo A, Marczak M, Jablonska S, Bollag W. Synergistic effect of retinoids and interferon α on tumor-induced angiogenesis: Anti-angiogenic effect on HPV-harboring tumor-cell lines. *Int J Cancer*. 1994;57(1):81-5.
290. von Marschall Z, Scholz A, Cramer T, Schäfer G, Schirner M, Öberg K, et al. Effects of Interferon Alpha on Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription and Tumor Angiogenesis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(6):437-48.

291. Flandrin G, Sigaux F, Castaigne S, Billard C, Aguet M, Boiron M, et al. Treatment of hairy cell leukemia with recombinant alpha interferon: I. Quantitative study of bone marrow changes during the first months of treatment. *Blood*. 1986;67(3):817-20.
292. Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist*. 2001;6(1):34-55.
293. Boulestin A, Kamar N, Sandres-Sauné K, Alric L, Vinel J-P, Rostaing L, et al. Pegylation of IFN-alpha and antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res*. 2006;26(12):849-53.
294. Fioravanti J, González I, Medina-Echeverz J, Larrea E, Ardaiz N, González-Aseguinolaza G, et al. Anchoring interferon alpha to apolipoprotein A-I reduces hematological toxicity while enhancing immunostimulatory properties. *Hepatology*. 2011;53(6):1864-73.
295. Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med*. 1991;174(1):139-49.
296. Somanchi SS, Lee DA. Ex Vivo Expansion of Human NK Cells Using K562 Engineered to Express Membrane Bound IL21. *Methods Mol Biol*. 2016;1441:175-93.
297. Liao W, Lin J-X, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(5):598-604.
298. Beyer M. Interleukin-2 treatment of tumor patients can expand regulatory T cells. *Oncoimmunology*. 2012;1(7):1181-2.
299. Charych D, Khalili S, Dixit V, Kirk P, Chang T, Langowski J, et al. Modeling the receptor pharmacology, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of NKTR-214, a kinetically-controlled interleukin-2 (IL2) receptor agonist for cancer immunotherapy. *PLoS One*. 2017;12(7):e0179431-e.
300. Lotze MT, Matory YL, Rayner AA, Ettinghausen SE, Vetto JT, Seipp CA, et al. Clinical effects and toxicity of interleukin-2 in patients with cancer. *Cancer*. 1986;58(12):2764-72.
301. Klein C, Waldhauer I, Nicolini VG, Freimoser-Grundschober A, Nayak T, Vugts DJ, et al. Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines. *Oncoimmunology*. 2017;6(3):e1277306-e.

302. Wrangle JM, Velcheti V, Patel MR, Garrett-Mayer E, Hill EG, Ravenel JG, et al. ALT-803, an IL-15 superagonist, in combination with nivolumab in patients with metastatic non-small cell lung cancer: a non-randomised, open-label, phase 1b trial. *The Lancet Oncology*. 2018;19(5):694-704.
303. Ochoa MC, Melero I, Berraondo P. High-density lipoproteins delivering interleukin-15. *Oncoimmunology*. 2013;2(4):e23410-e.
304. Oyer JL, Igarashi RY, Kulikowski AR, Colosimo DA, Solh MM, Zakari A, et al. Generation of Highly Cytotoxic Natural Killer Cells for Treatment of Acute Myelogenous Leukemia Using a Feeder-Free, Particle-Based Approach. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(4):632-9.
305. Schmidt H, Brown J, Mouritzen U, Selby P, Fode K, Svane IM, et al. Safety and clinical effect of subcutaneous human interleukin-21 in patients with metastatic melanoma or renal cell carcinoma: a phase I trial. *Clin Cancer Res*. 2010;16(21):5312-9.
306. Hodi FS, Lee S, McDermott DF, Rao UN, Butterfield LH, Tarhini AA, et al. Ipilimumab plus sargramostim vs ipilimumab alone for treatment of metastatic melanoma: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;312(17):1744-53.
307. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006;443(7109):350-4.
308. Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends in Immunology*. 2014;35(2):51-60.
309. Illingworth J, Butler NS, Roetynck S, Mwacharo J, Pierce SK, Bejon P, et al. Chronic Exposure to *Plasmodium falciparum* Is Associated with Phenotypic Evidence of B and T Cell Exhaustion. *The Journal of Immunology*. 2013;190(3):1038-47.
310. Mu C-Y, Huang J-A, Chen Y, Chen C, Zhang X-G. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Medical Oncology*. 2011;28(3):682-8.
311. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol*. 2010;28(19):3167-75.
312. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (New York, NY)*. 1996;271(5256):1734-6.

313. Fehlings M, Simoni Y, Penny HL, Becht E, Loh CY, Gubin MM, et al. Checkpoint blockade immunotherapy reshapes the high-dimensional phenotypic heterogeneity of murine intratumoural neoantigen-specific CD8⁺ T cells. *Nature Communications*. 2017;8(1):562.
314. Sharma P, Wagner K, Wolchok JD, Allison JP. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(11):805-12.
315. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711-23.
316. Weber JS, Gibney G, Sullivan RJ, Sosman JA, Slingluff CL, Jr., Lawrence DP, et al. Sequential administration of nivolumab and ipilimumab with a planned switch in patients with advanced melanoma (CheckMate 064): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(7):943-55.
317. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515(7528):568-71.
318. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-39.
319. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(21):2018-28.
320. He Y, Cao J, Zhao C, Li X, Zhou C, Hirsch FR. TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *Onco Targets Ther*. 2018;11:7005-9.
321. Ascierto PA, Melero I, Bhatia S, Bono P, Sanborn RE, Lipson EJ, et al. Initial efficacy of anti-lymphocyte activation gene-3 (anti-LAG-3; BMS-986016) in combination with nivolumab (nivo) in pts with melanoma (MEL) previously treated with anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):9520-.
322. Kähler KC, Hassel JC, Heinzerling L, Loquai C, Mössner R, Ugurel S, et al. Management of side effects of immune checkpoint blockade by anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies in metastatic melanoma. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2016;14(7):662-81.
323. Carbognin L, Pilotto S, Milella M, Vaccaro V, Brunelli M, Calì A, et al. Differential Activity of Nivolumab, Pembrolizumab and MPDL3280A according to the Tumor Expression of

Programmed Death-Ligand-1 (PD-L1): Sensitivity Analysis of Trials in Melanoma, Lung and Genitourinary Cancers. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130142.

324. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*. 2015;372(4):320-30.

325. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348(6230):124-8.

326. Longo V, Brunetti O, Azzariti A, Galetta D, Nardulli P, Leonetti F, et al. Strategies to Improve Cancer Immune Checkpoint Inhibitors Efficacy, Other Than Abscopal Effect: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4):539.

327. Philip M, Fairchild L, Sun L, Horste EL, Camara S, Shakiba M, et al. Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature*. 2017;545(7655):452-6.

328. Pauken KE, Sammons MA, Odorizzi PM, Manne S, Godec J, Khan O, et al. Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science (New York, NY)*. 2016;354(6316):1160-5.

329. Assouline S, Buccheri V, Delmer A, Gaidano G, Trneny M, Berthillon N, et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of subcutaneous versus intravenous rituximab plus chemotherapy as treatment for chronic lymphocytic leukaemia (SAWYER): a phase 1b, open-label, randomised controlled non-inferiority trial. *Lancet Haematol*. 2016;3(3):e128-e38.

330. Davies A, Merli F, Mihaljevic B, Siritanaratkul N, Solal-Céligny P, Barrett M, et al. Pharmacokinetics and safety of subcutaneous rituximab in follicular lymphoma (SABRINA): stage 1 analysis of a randomised phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2014;15(3):343-52.

331. Niederfellner G, Lammens A, Mundigl O, Georges GJ, Schaefer W, Schwaiger M, et al. Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood*. 2011;118(2):358-67.

332. Harjunpää A, Junnikkala S, Meri S. Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand J Immunol*. 2000;51(6):634-41.

333. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83(2):435-45.

334. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, Kotowski A, Binder A, Kaur H, et al. Acquirement of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin Cancer Res.* 2008;14(5):1561-70.
335. Unruh TL, Li H, Mutch CM, Shariat N, Grigoriou L, Sanyal R, et al. Cholesterol depletion inhibits src family kinase-dependent calcium mobilization and apoptosis induced by rituximab crosslinking. *Immunology.* 2005;116(2):223-32.
336. Chen DR, Cohen PL. Living life without B cells: is repeated B-cell depletion a safe and effective long-term treatment plan for rheumatoid arthritis? *Int J Clin Rheumtol.* 2012;7(2):159-66.
337. Kasi PM, Tawbi HA, Oddis CV, Kulkarni HS. Clinical review: Serious adverse events associated with the use of rituximab - a critical care perspective. *Crit Care.* 2012;16(4):231-.
338. Duman BB, Sahin B, Ergin M, Guvenc B. Loss of CD20 antigen expression after rituximab therapy of CD20 positive B cell lymphoma (diffuse large B cell extranodal marginal zone lymphoma combination): a case report and review of the literature. *Med Oncol.* 2012;29(2):1223-6.
339. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Annals of Oncology.* 2014;25(8):1544-50.
340. Wiernik A, Foley B, Zhang B, Verneris MR, Warlick E, Gleason MK, et al. Targeting natural killer cells to acute myeloid leukemia in vitro with a CD16 x 33 bispecific killer cell engager and ADAM17 inhibition. *Clin Cancer Res.* 2013;19(14):3844-55.
341. Vallera DA, Felices M, McElmurry R, McCullar V, Zhou X, Schmohl JU, et al. IL15 Trispecific Killer Engagers (TriKE) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing Persistence, In Vivo Expansion, and Enhanced Function. *Clin Cancer Res.* 2016;22(14):3440-50.
342. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotný J, Margolies MN, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(16):5879-83.
343. Cheng Y, Li Z, Xi H, Gu T, Yuan R, Chen X, et al. A VL-linker-VH Orientation Dependent Single Chain Variable Antibody Fragment Against Rabies Virus G Protein with Enhanced Neutralizing Potency in vivo. *Protein Pept Lett.* 2016;23(1):24-32.

344. Haryadi R, Ho S, Kok YJ, Pu HX, Zheng L, Pereira NA, et al. Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116878-e.
345. Qin L, Lai Y, Zhao R, Wei X, Weng J, Lai P, et al. Incorporation of a hinge domain improves the expansion of chimeric antigen receptor T cells. *Journal of Hematology & Oncology*. 2017;10(1):68.
346. Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, Pfeiffer T, Olivares S, Gonzalez N, et al. CD28 Costimulation Provided through a CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor Enhances In vivo Persistence and Antitumor Efficacy of Adoptively Transferred T Cells. *Cancer Research*. 2006;66(22):10995-1004.
347. Zhong X-S, Matsushita M, Plotkin J, Riviere I, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptors Combining 4-1BB and CD28 Signaling Domains Augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL Activation and CD8+ T Cell-mediated Tumor Eradication. *Molecular Therapy*. 2010;18(2):413-20.
348. Song D-G, Ye Q, Carpenito C, Poussin M, Wang L-P, Ji C, et al. *In Vivo* Persistence, Tumor Localization, and Antitumor Activity of CAR-Engineered T Cells Is Enhanced by Costimulatory Signaling through CD137 (4-1BB). *Cancer Research*. 2011;71(13):4617-27.
349. Paszkiewicz PJ, Fräßle SP, Srivastava S, Sommermeyer D, Hudecek M, Drexler I, et al. Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(11):4262-72.
350. Wang Q-s, Wang Y, Lv H-y, Han Q-w, Fan H, Guo B, et al. Treatment of CD33-directed Chimeric Antigen Receptor-modified T Cells in One Patient With Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Molecular Therapy*. 2015;23(1):184-91.
351. Sadelain M. CAR therapy: the CD19 paradigm. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(9):3392-400.
352. Cordeiro A, Bezerra ED, Hirayama AV, Hill JA, Wu QV, Voutsinas J, et al. Late Events after Treatment with CD19-Targeted Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2020;26(1):26-33.
353. Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood*. 2011;118(23):6050-6.

354. Simon T, Hero B, Faldum A, Handgretinger R, Schrappe M, Niethammer D, et al. Consolidation Treatment With Chimeric Anti-GD2-Antibody ch14.18 in Children Older Than 1 Year With Metastatic Neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;22(17):3549-57.
355. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, et al. Anti-GD2 Antibody with GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(14):1324-34.
356. Ehninger A, Kramer M, Röllig C, Thiede C, Bornhäuser M, von Bonin M, et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood cancer journal*. 2014;4(6):e218-e.
357. Dutta S, Saxena R. The Expression Pattern of CD33 Antigen Can Differentiate Leukemic from Normal Progenitor Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2014;30(2):130-4.
358. Hernández-Caselles T, Martínez-Esparza M, Pérez-Oliva AB, Quintanilla-Cecconi AM, García-Alonso A, Alvarez-López DMR, et al. A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J Leukoc Biol*. 2006;79(1):46-58.
359. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*. 2010;18(4):843-51.
360. Berger MF, Mardis ER. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(6):353-65.
361. Gubin MM, Artyomov MN, Mardis ER, Schreiber RD. Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(9):3413-21.
362. Caron E, Espona L, Kowalewski DJ, Schuster H, Ternette N, Alpizar A, et al. An open-source computational and data resource to analyze digital maps of immunopeptidomes. *Elife*. 2015;4:e07661.
363. Wang R-F, Wang HY. Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine. *Cell Res*. 2017;27(1):11-37.
364. Kalaora S, Barnea E, Merhavi-Shoham E, Qutob N, Teer JK, Shimony N, et al. Use of HLA peptidomics and whole exome sequencing to identify human immunogenic neo-antigens. *Oncotarget*. 2016;7(5):5110-7.

365. Xu C. A review of somatic single nucleotide variant calling algorithms for next-generation sequencing data. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018;16:15-24.
366. Salah-eldin A-e, Inoue S, Tsuda M, Matsuura A. Abnormal Intracellular Localization of Bax with a Normal Membrane Anchor Domain in Human Lung Cancer Cell Lines. *Japanese Journal of Cancer Research*. 2000;91(12):1269-77.
367. Radons J, Multhoff G. Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70. *Exerc Immunol Rev*. 2005;11:17-33.
368. Büll C, Boltje TJ, Wassink M, de Graaf AMA, van Delft FL, den Brok MH, et al. Targeting aberrant sialylation in cancer cells using a fluorinated sialic acid analog impairs adhesion, migration, and in vivo tumor growth. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(10):1935-46.
369. Costa C, Pereira S, Lima L, Peixoto A, Fernandes E, Neves D, et al. Abnormal Protein Glycosylation and Activated PI3K/Akt/mTOR Pathway: Role in Bladder Cancer Prognosis and Targeted Therapeutics. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141253.
370. Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med*. 2013;5(215):215ra172-215ra172.
371. Tkachuk D, Westbrook C, Andreeff M, Donlon T, Cleary M, Suryanarayan K, et al. Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogeneous leukemia by in situ hybridization. *Science*. 1990;250(4980):559-62.
372. Wei Z, Zhou C, Zhang Z, Guan M, Zhang C, Liu Z, et al. The Landscape of Tumor Fusion Neoantigens: A Pan-Cancer Analysis. *iScience*. 2019;21:249-60.
373. Marty Pyke R, Thompson WK, Salem RM, Font-Burgada J, Zanetti M, Carter H. Evolutionary Pressure against MHC Class II Binding Cancer Mutations. *Cell*. 2018;175(2):416-28.e13.
374. Sveen A, Kilpinen S, Ruusulehto A, Lothe RA, Skotheim RI. Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene*. 2016;35(19):2413-27.
375. Jonnalagadda M, Mardiros A, Urak R, Wang X, Hoffman LJ, Bernanke A, et al. Chimeric Antigen Receptors With Mutated IgG4 Fc Spacer Avoid Fc Receptor Binding and Improve T Cell Persistence and Antitumor Efficacy. *Molecular Therapy*. 2015;23(4):757-68.

376. Hombach AA, Schildgen V, Heuser C, Finnern R, Gilham DE, Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: the position of the binding epitope within the target molecule determines the efficiency of activation of redirected T cells. *J Immunol*. 2007;178(7):4650-7.
377. Alabanza L, Pegues M, Geldres C, Shi V, Wiltzius JJW, Sievers SA, et al. Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains. *Mol Ther*. 2017;25(11):2452-65.
378. Brocker T. Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood*. 2000;96(5):1999-2001.
379. Finney HM, Lawson AD, Bebbington CR, Weir AN. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol*. 1998;161(6):2791-7.
380. Hombach A, Wieczarkowicz A, Marquardt T, Heuser C, Usai L, Pohl C, et al. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J Immunol*. 2001;167(11):6123-31.
381. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Rivière I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol*. 2002;20(1):70-5.
382. Guedan S, Calderon H, Posey AD, Jr., Maus MV. Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;12:145-56.
383. Imai C, Mihara K, Andreansky M, Nicholson IC, Pui CH, Geiger TL, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004;18(4):676-84.
384. Ying Z, He T, Wang X, Zheng W, Lin N, Tu M, et al. Parallel Comparison of 4-1BB or CD28 Co-stimulated CD19-Targeted CAR-T Cells for B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Molecular Therapy - Oncolytics*. 2019;15:60-8.
385. Tang X-Y, Sun Y, Zhang A, Hu G-L, Cao W, Wang D-H, et al. Third-generation CD28/4-1BB chimeric antigen receptor T cells for chemotherapy relapsed or refractory acute lymphoblastic leukaemia: a non-randomised, open-label phase I trial protocol. *BMJ Open*. 2016;6(12):e013904.
386. Enblad G, Karlsson H, Gammelgård G, Wenthe J, Lövgren T, Amini RM, et al. A Phase I/IIa Trial Using CD19-Targeted Third-Generation CAR T Cells for Lymphoma and Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(24):6185-94.

387. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1507-17.
388. Zheng P-P, Kros JM, Li J. Approved CAR T cell therapies: ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. *Drug Discovery Today*. 2018;23(6):1175-82.
389. Giavridis T, van der Stegen SJC, Eyquem J, Hamieh M, Piersigilli A, Sadelain M. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nature medicine*. 2018;24(6):731-8.
390. Santomasso B, Bachier C, Westin J, Rezvani K, Shpall EJ. The Other Side of CAR T-Cell Therapy: Cytokine Release Syndrome, Neurologic Toxicity, and Financial Burden. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2019(39):433-44.
391. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, et al. Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra25-ra25.
392. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet*. 2015;385(9967):517-28.
393. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy*. 2016;8(8):959-70.
394. Norelli M, Camisa B, Barbiera G, Falcone L, Purevdorj A, Genua M, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nature medicine*. 2018;24(6):739-48.
395. Wang Z, Han W. Biomarkers of cytokine release syndrome and neurotoxicity related to CAR-T cell therapy. *Biomark Res*. 2018;6:4-.
396. Xu X, Sun Q, Liang X, Chen Z, Zhang X, Zhou X, et al. Mechanisms of Relapse After CD19 CAR T-Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Prevention and Treatment Strategies. *Front Immunol*. 2019;10(2664).
397. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JJD, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med*. 2017;9(399):eaaa0984.

398. Jahani-Asl A, Yin H, Soleimani VD, Haque T, Luchman HA, Chang NC, et al. Control of glioblastoma tumorigenesis by feed-forward cytokine signaling. *Nat Neurosci*. 2016;19(6):798-806.
399. Posey AD, Jr., Schwab RD, Boesteanu AC, Steentoft C, Mandel U, Engels B, et al. Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer-Associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma. *Immunity*. 2016;44(6):1444-54.
400. Turner J-E, Stockinger B, Helmby H. IL-22 Mediates Goblet Cell Hyperplasia and Worm Expulsion in Intestinal Helminth Infection. *PLoS pathogens*. 2013;9:e1003698.
401. Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, Shestova O, Hofmann TJ, Perazzelli J, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(10):3814-26.
402. Zah E, Lin M-Y, Silva-Benedict A, Jensen MC, Chen YY. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer immunology research*. 2016;4(6):498-508.
403. Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, Keir C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 2017;4:92-101.
404. Carlsten M, Childs RW. Genetic Manipulation of NK Cells for Cancer Immunotherapy: Techniques and Clinical Implications. *Front Immunol*. 2015;6(266).
405. Baboo J, Kilbride P, Delahaye M, Milne S, Fonseca F, Blanco M, et al. The Impact of Varying Cooling and Thawing Rates on the Quality of Cryopreserved Human Peripheral Blood T Cells. *Scientific Reports*. 2019;9(1):3417.
406. Matosevic S. Viral and Nonviral Engineering of Natural Killer Cells as Emerging Adoptive Cancer Immunotherapies. *Journal of immunology research*. 2018;2018:4054815.
407. Girard-Gagnepain A, Amirache F, Costa C, Lévy C, Frecha C, Fusil F, et al. Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood*. 2014;124(8):1221-31.
408. Witkowski W, Vermeire J, Landi A, Naessens E, Vanderstraeten H, Nauwynck H, et al. Vpx-Independent Lentiviral Transduction and shRNA-Mediated Protein Knock-Down in Monocyte-Derived Dendritic Cells. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133651-e.

409. Li G, Boucher JC, Kotani H, Park K, Zhang Y, Shrestha B, et al. 4-1BB enhancement of CAR T function requires NF- κ B and TRAFs. *JCI Insight*. 2018;3(18):e121322.
410. Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nature Medicine*. 2015;21(6):581-90.
411. Gomes-Silva D, Mukherjee M, Srinivasan M, Krenciute G, Dakhova O, Zheng Y, et al. Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent. *Cell Rep*. 2017;21(1):17-26.
412. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJC, Hamieh M, Cunanan KM, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*. 2017;543(7643):113-7.
413. Chu J, Deng Y, Benson DM, He S, Hughes T, Zhang J, et al. CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28(4):917-27.
414. Liu E, Tong Y, Dotti G, Shaim H, Savoldo B, Mukherjee M, et al. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia*. 2018;32(2):520-31.
415. Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, Thompson P, Basar R, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(6):545-53.
416. Merlin S, Follenzi A. Transcriptional Targeting and MicroRNA Regulation of Lentiviral Vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019;12:223-32.
417. Counsell JR, Asgarian Z, Meng J, Ferrer V, Vink CA, Howe SJ, et al. Lentiviral vectors can be used for full-length dystrophin gene therapy. *Scientific Reports*. 2017;7(1):44775.
418. Chen X, Wu J-m, Hornischer K, Kel A, Wingender E. TiProD: the Tissue-specific Promoter Database. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(suppl_1):D104-D7.
419. Zheng C, Baum BJ. Evaluation of promoters for use in tissue-specific gene delivery. *Methods Mol Biol*. 2008;434:205-19.

420. Haddad P, Wargnier A, Bourge J-F, Sasportes M, Paul P. A promoter element of the human serine esterase granzyme B gene controls specific transcription in activated T cells. *European Journal of Immunology*. 1993;23(3):625-9.
421. Brown BD, Cantore A, Annoni A, Sergi LS, Lombardo A, Della Valle P, et al. A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood*. 2007;110(13):4144-52.
422. Masiuk KE, Laborada J, Roncarolo MG, Hollis RP, Kohn DB. Lentiviral Gene Therapy in HSCs Restores Lineage-Specific Foxp3 Expression and Suppresses Autoimmunity in a Mouse Model of IPEX Syndrome. *Cell Stem Cell*. 2019;24(2):309-17.e7.
423. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Basile GdS, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, et al. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science*. 2000;288(5466):669-72.
424. Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, Yu Z-F, Tillman A, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017;390(10097):849-60.
425. Chabannon C, Kuball J, Bondanza A, Dazzi F, Pedrazzoli P, Toubert A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in its 60s: A platform for cellular therapies. *Sci Transl Med*. 2018;10(436):eaap9630.
426. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, Cassani B, Callegaro L, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(5):447-58.
427. Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A, Banerjee PP, Díez IA, Dewey RA, et al. Stem-Cell Gene Therapy for the Wiskott–Aldrich Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(20):1918-27.
428. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 2009;114(13):2619-22.
429. Kerns HM, Ryu BY, Stirling BV, Sather BD, Astrakhan A, Humblet-Baron S, et al. B cell-specific lentiviral gene therapy leads to sustained B-cell functional recovery in a murine model of X-linked agammaglobulinemia. *Blood*. 2010;115(11):2146-55.

430. Brown MP, Topham DJ, Sangster MY, Zhao J, Flynn KJ, Surman SL, et al. Thymic lymphoproliferative disease after successful correction of CD40 ligand deficiency by gene transfer in mice. *Nature Medicine*. 1998;4(11):1253-60.
431. Rivière J, Soheili T, Verhoeyen E, Galy A, de Saint Basile G, Fischer A, et al. Stem Cell and T-Cell Gene Therapy Using SIN-Lentiviral Vector In Type 3 Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Blood*. 2013;122(21):4214-.
432. Dettmer V, Bloom K, Gross M, Weissert K, Aichele P, Ehl S, et al. Retroviral UNC13D Gene Transfer Restores Cytotoxic Activity of T Cells Derived from Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Type 3 Patients In Vitro. *Hum Gene Ther*. 2019;30(8):975-84.
433. Booth C, Carmo M, Gaspar HB. Gene therapy for haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Curr Gene Ther*. 2014;14(6):437-46.
434. Hunter MJ, Zhao H, Tuschong LM, Bauer TR, Jr., Burkholder TH, Persons DA, et al. Gene therapy for canine leukocyte adhesion deficiency with lentiviral vectors using the murine stem cell virus and human phosphoglycerate kinase promoters. *Hum Gene Ther*. 2011;22(6):689-96.
435. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(9):3132-42.
436. Brooks AR, Harkins RN, Wang P, Qian HS, Liu P, Rubanyi GM. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *The Journal of Gene Medicine*. 2004;6(4):395-404.
437. De Oliveira SN, Ryan C, Giannoni F, Hardee CL, Tremcinska I, Katebian B, et al. Modification of hematopoietic stem/progenitor cells with CD19-specific chimeric antigen receptors as a novel approach for cancer immunotherapy. *Hum Gene Ther*. 2013;24(10):824-39.
438. Albert S, Koristka S, Gerbaulet A, Cartellieri M, Arndt C, Feldmann A, et al. Tonic Signaling and Its Effects on Lymphopoiesis of CAR-Armed Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *The Journal of Immunology*. 2019;202(6):1735-46.
439. Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, Hoof I, Bornholdt J, Boyd M, et al. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*. 2014;507(7493):455-61.
440. Canté-Barrett K, Mendes RD, Smits WK, van Helsdingen-van Wijk YM, Pieters R, Meijerink JP. Lentiviral gene transfer into human and murine hematopoietic stem cells: size matters. *BMC research notes*. 2016;9:312.

441. Forrest ARR, Kawaji H, Rehli M, Kenneth Baillie J, de Hoon MJL, Haberle V, et al. A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*. 2014;507(7493):462-70.
442. Mohtashami M, Shah DK, Kianizad K, Awong G, Zúñiga-Pflücker JC. Induction of T-cell development by Delta-like 4-expressing fibroblasts. *Int Immunol*. 2013;25(10):601-11.
443. Yu J, Choi S, Kim H, Lee N, Yun H, Kim S, et al. Generation of an osteoblast-based artificial niche that supports in vitro B lymphopoiesis. *Experimental & molecular medicine*. 2017;49(11):e400.
444. Lowe E, Truscott LC, De Oliveira SN. In Vitro Generation of Human NK Cells Expressing Chimeric Antigen Receptor Through Differentiation of Gene-Modified Hematopoietic Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2016;1441:241-51.
445. Ede C, Chen X, Lin M-Y, Chen YY. Quantitative Analyses of Core Promoters Enable Precise Engineering of Regulated Gene Expression in Mammalian Cells. *ACS Synth Biol*. 2016;5(5):395-404.
446. Miao CH, Ye X, Thompson AR. High-Level Factor VIII Gene Expression In Vivo Achieved by Nonviral Liver-Specific Gene Therapy Vectors. *Hum Gene Ther*. 2003;14(14):1297-305.
447. Gschweng E, De Oliveira S, Kohn DB. Hematopoietic stem cells for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 2014;257(1):237-49.
448. Lin WY, Roberts MR. Developmental dissociation of T cells from B, NK, and myeloid cells revealed by MHC class II-specific chimeric immune receptors bearing TCR-zeta or FcR-gamma chain signaling domains. *Blood*. 2002;100(8):3045-8.
449. Colamartino ABL, Lemieux W, Bifsha P, Nicoletti S, Chakravarti N, Sanz J, et al. Efficient and Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector. *Front Immunol*. 2019;10(2873).
450. Melkus MW, Estes JD, Padgett-Thomas A, Gatlin J, Denton PW, Othieno FA, et al. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nature Medicine*. 2006;12(11):1316-22.
451. Liu D, Tian S, Zhang K, Xiong W, Lubaki NM, Chen Z, et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-modified natural killer cell-based immunotherapy and immunological synapse formation in cancer and HIV. *Protein Cell*. 2017;8(12):861-77.

452. Lapteva N, Parihar R, Rollins LA, Gee AP, Rooney CM. Large-Scale Culture and Genetic Modification of Human Natural Killer Cells for Cellular Therapy. *Methods Mol Biol.* 2016;1441:195-202.
453. Klingemann H, Boissel L, Toneguzzo F. Natural Killer Cells for Immunotherapy - Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Front Immunol.* 2016;7:91-.
454. Williams BA, Law AD, Routy B, denHollander N, Gupta V, Wang X-H, et al. A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows safety and evidence of efficacy. *Oncotarget.* 2017;8(51):89256-68.
455. Arai S, Meagher R, Swearingen M, Myint H, Rich E, Martinson J, et al. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy.* 2008;10(6):625-32.
456. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockey T, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer research.* 2009;69(9):4010-7.
457. Li Y, Hermanson DL, Moriarity BS, Kaufman DS. Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity. *Cell Stem Cell.* 2018;23(2):181-92.e5.
458. Kagoya Y, Tanaka S, Guo T, Anczurowski M, Wang C-H, Saso K, et al. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nature medicine.* 2018;24(3):352-9.
459. Liang G, Zhang Y. Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell.* 2013;13(2):149-59.
460. de Almeida PE, Meyer EH, Kooreman NG, Diecke S, Dey D, Sanchez-Freire V, et al. Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance. *Nature communications.* 2014;5:3903-.
461. Zhao T, Zhang Z-N, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011;474(7350):212-5.
462. Benabdallah B, Désaulniers-Langevin C, Colas C, Li Y, Rousseau G, Guimond JV, et al. Natural Killer Cells Prevent the Formation of Teratomas Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Front Immunol.* 2019;10:2580-.
463. Crow D. Could iPSCs Enable "Off-the-Shelf" Cell Therapy? *Cell.* 2019;177(7):1667-9.

464. Wang B, Li J, Fu FH, Chen C, Zhu X, Zhou L, et al. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Therapy*. 2008;15(22):1489-99.
465. Kramer MG, Barajas M, Razquin N, Berraondo P, Rodrigo M, Wu C, et al. In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters. *Molecular Therapy*. 2003;7(3):375-85.
466. Neeft M, Wieffer M, Jong ASd, Negroiu G, Metz CHG, Loon Av, et al. Munc13-4 Is an Effector of Rab27a and Controls Secretion of Lysosomes in Hematopoietic Cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2005;16(2):731-41.
467. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EGD, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, et al. Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(21):1994-2004.
468. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(9):3143-50.
469. Pike-Overzet K, Baum C, Bredius RGM, Cavazzana M, Driessen G-J, Fibbe WE, et al. Successful RAG1-SCID gene therapy depends on the level of RAG1 expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014;134(1):242-3.
470. Fraietta JA, Lacey SF, Orlando EJ, Pruteanu-Malinici I, Gohil M, Lundh S, et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nature medicine*. 2018;24(5):563-71.
471. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. Sorting through subsets: which T-cell populations mediate highly effective adoptive immunotherapy? *J Immunother*. 2012;35(9):651-60.
472. Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(6):2123-38.
473. Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Ponzoni M, Bartholomae C, et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol*. 2006;24(6):687-96.
474. Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer research*. 1986;46(10):5276-81.

475. Greco R, Oliveira G, Stanghellini MTL, Vago L, Bondanza A, Peccatori J, et al. Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene. *Frontiers in pharmacology*. 2015;6:95-.
476. Kokoris MS, Black ME. Characterization of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants engineered for improved ganciclovir or acyclovir activity. *Protein Sci*. 2002;11(9):2267-72.
477. Straathof KC, Pulè MA, Yotnda P, Dotti G, Vanin EF, Brenner MK, et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*. 2005;105(11):4247-54.
478. Tasian SK, Kenderian SS, Shen F, Ruella M, Shestova O, Kozlowski M, et al. Optimized depletion of chimeric antigen receptor T cells in murine xenograft models of human acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;129(17):2395-407.
479. Chien C-H, Chiang B-L. Regulatory T cells induced by B cells: a novel subpopulation of regulatory T cells. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):86-.
480. Fend F, Nachbaur D, Oberwasserlechner F, Kreczy A, Huber H, Müller-Hermelink HK. Phenotype and topography of human thymic B cells. An immunohistologic study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1991;60(6):381-8.
481. Larson SM, Truscott LC, Chiou T-T, Patel A, Kao R, Tu A, et al. Pre-clinical development of gene modification of haematopoietic stem cells with chimeric antigen receptors for cancer immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(5):1094-104.
482. Ruella M, Xu J, Barrett DM, Fraietta JA, Reich TJ, Ambrose DE, et al. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nature Medicine*. 2018;24(10):1499-503.
483. Cao Y, Lu W, Sun R, Jin X, Cheng L, He X, et al. Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells in Combination With Nivolumab Are Safe and Effective Against Relapsed/Refractory B-Cell Non-hodgkin Lymphoma. *Front Oncol*. 2019;9:767-.
484. Nayar S, Dasgupta P, Galustian C. Extending the lifespan and efficacies of immune cells used in adoptive transfer for cancer immunotherapies-A review. *Oncoimmunology*. 2015;4(4):e1002720-e.
485. Silva D-A, Yu S, Ulge UY, Spangler JB, Jude KM, Labão-Almeida C, et al. De novo design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15. *Nature*. 2019;565(7738):186-91.

486. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*. 2012;119(18):4133-41.
487. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science (New York, NY)*. 2002;298(5594):850-4.
488. Shum T, Kruse RL, Rooney CM. Strategies for enhancing adoptive T-cell immunotherapy against solid tumors using engineered cytokine signaling and other modalities. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18(6):653-64.
489. Yeku OO, Brentjens RJ. Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochem Soc Trans*. 2016;44(2):412-8.
490. Zhao W, Jia L, Zhang M, Huang X, Qian P, Tang Q, et al. The killing effect of novel bi-specific Trop2/PD-L1 CAR-T cell targeted gastric cancer. *Am J Cancer Res*. 2019;9(8):1846-56.
491. Yoon DH, Osborn MJ, Tolar J, Kim CJ. Incorporation of Immune Checkpoint Blockade into Chimeric Antigen Receptor T Cells (CAR-Ts): Combination or Built-In CAR-T. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):340.
492. Jia H, Wang Z, Wang Y, Liu Y, Dai H, Tong C, et al. Haploidentical CD19/CD22 bispecific CAR-T cells induced MRD-negative remission in a patient with relapsed and refractory adult B-ALL after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of hematology & oncology*. 2019;12(1):57-.
493. Oelsner S, Wagner J, Friede ME, Pfirrmann V, Genßler S, Rettinger E, et al. Chimeric antigen receptor-engineered cytokine-induced killer cells overcome treatment resistance of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia and enhance survival. *Int J Cancer*. 2016;139(8):1799-809.
494. Morrissey MA, Williamson AP, Steinbach AM, Roberts EW, Kern N, Headley MB, et al. Chimeric antigen receptors that trigger phagocytosis. *eLife*. 2018;7:e36688.
495. Zhang W, Liu L, Su H, Liu Q, Shen J, Dai H, et al. Chimeric antigen receptor macrophage therapy for breast tumours mediated by targeting the tumour extracellular matrix. *Br J Cancer*. 2019;121(10):837-45.
496. Klichinsky M, Ruella M, Shestova O, Kenderian SS, Kim MY, O'Connor R, et al. Abstract 4575: Chimeric antigen receptor macrophages (CARMA) for adoptive cellular immunotherapy of solid tumors. *Cancer Research*. 2017;77(13 Supplement):4575-.

497. Guedan S, Posey AD, Jr., Shaw C, Wing A, Da T, Patel PR, et al. Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation. *JCI Insight*. 2018;3(1):e96976.
498. Caruso HG, Hurton LV, Najjar A, Rushworth D, Ang S, Olivares S, et al. Tuning Sensitivity of CAR to EGFR Density Limits Recognition of Normal Tissue While Maintaining Potent Antitumor Activity. *Cancer research*. 2015;75(17):3505-18.
499. Ekstrand AJ, Longo N, Hamid ML, Olson JJ, Liu L, Collins VP, et al. Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene*. 1994;9(8):2313-20.
500. Ren P-P, Li M, Li T-F, Han S-Y. Anti-EGFRvIII Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for Adoptive Cell Therapy of Glioblastoma. *Curr Pharm Des*. 2017;23(14):2113-6.
501. Heczey A, Louis CU, Savoldo B, Dakhova O, Durett A, Grilley B, et al. CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma. *Mol Ther*. 2017;25(9):2214-24.
502. Gargett T, Yu W, Dotti G, Yvon ES, Christo SN, Hayball JD, et al. GD2-specific CAR T Cells Undergo Potent Activation and Deletion Following Antigen Encounter but can be Protected From Activation-induced Cell Death by PD-1 Blockade. *Mol Ther*. 2016;24(6):1135-49.
503. Richman SA, Nunez-Cruz S, Moghimi B, Li LZ, Gershenson ZT, Mourelatos Z, et al. High-Affinity GD2-Specific CAR T Cells Induce Fatal Encephalitis in a Preclinical Neuroblastoma Model. *Cancer immunology research*. 2018;6(1):36-46.
504. Wang Y, Ju T, Ding X, Xia B, Wang W, Xia L, et al. Cosmc is an essential chaperone for correct protein O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(20):9228-33.
505. Lamers CH, Sleijfer S, van Steenbergen S, van Elzakker P, van Krimpen B, Groot C, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol Ther*. 2013;21(4):904-12.
506. Chang K, Creighton CJ, Davis C, Donehower L, Drummond J, Wheeler D, et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature Genetics*. 2013;45(10):1113-20.
507. Berkers CR, de Jong A, Schuurman KG, Linnemann C, Meiring HD, Janssen L, et al. Definition of Proteasomal Peptide Splicing Rules for High-Efficiency Spliced Peptide Presentation by MHC Class I Molecules. *The Journal of Immunology*. 2015;195(9):4085-95.

508. Schuster H, Shao W, Weiss T, Pedrioli PGA, Roth P, Weller M, et al. A tissue-based draft map of the murine MHC class I immunopeptidome. *Scientific Data*. 2018;5(1):180157.
509. Caron E, Kowalewski DJ, Chiek Koh C, Sturm T, Schuster H, Aebersold R. Analysis of Major Histocompatibility Complex (MHC) Immunopeptidomes Using Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2015;14(12):3105-17.
510. Thomas R, Al-Khadairi G, Roelands J, Hendrickx W, Dermime S, Bedognetti D, et al. NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives. *Front Immunol*. 2018;9:947-.
511. Lin JK, Muffly LS, Spinner MA, Barnes JI, Owens DK, Goldhaber-Fiebert JD. Cost Effectiveness of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy in Multiply Relapsed or Refractory Adult Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(24):2105-19.

Annexes

CELL-SPECIFIC TRANSCRIPTIONAL REGULATORY SEQUENCES AND USES THEREOF

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

- 5 The present application claims the benefit of U.S. provisional application serial No. 62/796,254 filed on January 24, 2019, which is incorporated herein by reference in its entirety.

SEQUENCE LISTING

N/A.

TECHNICAL FIELD

- 10 The present invention generally relates to the targeted expression of genes in specific cell subtypes, for example immune cells such as T cells, B cells and natural killer (NK) cells, which may be used in hematopoietic stem cell (HSC) engineering and cell-based therapy.

BACKGROUND ART

- 15 The targeted expression of a transduced gene in a given cell subtype or tissue is challenging. With the growing fields of stem cell engineering and inducible pluripotent stem cells (iPS) research, there is a need for the ability to express a given protein only in targeted populations stemming from the parent cell. However, the use of traditional/natural promoter is faced with the technical issue of size and sometimes specificity. For example, currently, gene therapy for hematopoietic-related disorders relies on the transduction of HSC with a transgene under the control of a strong promoter^{1,2}. With this type of construct,
20 the cells that originate from the modified stem cells will express the new gene, irrespectively of the cell subtype, which could potentially lead to hazardous consequences.

- Chimeric Antigen Receptor (CAR) immune cell therapy has emerged as a promising new therapeutic tool against various cancer. In CAR immune cell therapy, patient's immune cells (*e.g.*, T cells, NK cells) are engineered to express CARs that binds to tumor antigens, which permits the specific killing
25 of tumor cells expressing the antigen. Currently, this strategy, although potent, typically does not last because of T-cell exhaustion and loss of engineered T cells *in vivo*. Moreover, the infusion of a large number of CAR-T cells may lead to high toxicity due to a massive release of cytokines (cytokine release syndrome). These is thus a need for an approach that permits the continuous and progressive replenishment of CAR-modified cells in the circulation, and which limits the expression of the CAR only to specific cells (*e.g.*, T
30 cells, NK cells).

The present description refers to a number of documents, the content of which is herein incorporated by reference in their entirety.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present disclosure provides the following items:

- 5 1. A synthetic expression cassette for expressing a nucleic acid of interest in a cell comprising:
 - (i) a minimal promoter; and
 - (ii) a transcriptional enhancer operatively coupled to the minimal promoter for expression of the gene of interest in the cell, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 70% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
- 10 2. The synthetic expression cassette of item 1, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 80% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
3. The synthetic expression cassette of item 1, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 90% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
4. The synthetic expression cassette of item 1, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 95% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
- 15 5. The synthetic expression cassette of item 1, wherein the transcriptional enhancer comprises or consists of one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
6. The synthetic expression cassette of any one of items 1 to 5, wherein the minimal promoter is a human cytomegalovirus CMV minimal promoter (miniCMV).
- 20 7. The synthetic expression cassette of item 6, wherein the minimal promoter comprises or consists of the sequence of SEQ ID NO:6.
8. The synthetic expression cassette of any one of items 1 to 7, wherein the transcriptional enhancer is upstream of the minimal promoter in the synthetic expression cassette.
9. The synthetic expression cassette of any one of items 1 to 8, further comprising a polyadenylation (poly(A)) signal.
- 25 10. The synthetic expression cassette of any one of items 1 to 9, further comprising a transcriptional termination signal.
11. The synthetic expression cassette of any one of items 1 to 10, further comprising the nucleic acid of interest operatively coupled to the minimal promoter and transcriptional enhancer.
- 30 12. The synthetic expression cassette of any one of items 1 to 11, further comprising a selectable marker.
13. The synthetic expression cassette of any one of items 1 to 12, wherein the cell is a stem cell.
14. The synthetic expression cassette of item 13, wherein the stem cell is a hematopoietic stem cell (HSC), an embryonic stem cell, a totipotent stem cell, a pluripotent stem cell, a multipotent stem cell or an induced pluripotent stem cell (iPSC).
- 35 15. The synthetic expression cassette of any one of items 1 to 12, wherein the cell is an immune cell.

16. The synthetic expression cassette of item 15, wherein the immune cell is a T cell, a natural killer (NK) cell, or a B cell.
17. The synthetic expression cassette of any one of items 1 to 16, wherein the nucleic acid of interest encoded a chimeric antigen receptor (CAR).
- 5 18. A vector comprising the synthetic expression cassette of any one of items 1 to 17.
19. The vector of item 18, wherein the vector is a viral vector.
20. A host cell comprising the synthetic expression cassette of any one of items 1 to 17 or the vector of item 18 or 19.
21. The host cell of item 20, wherein said cell is a hematopoietic stem cell, a T cell, a natural killer
10 (NK) cell, or a B cell.
22. A composition comprising the host cell of item 20 or 21.
23. A method for inducing the expression of a nucleic acid of interest by a cell, the method comprising introducing the synthetic expression cassette of any one of items 1 to 17 or the vector of item 18 or 19 in the cell.
- 15 24. The method of item 23, wherein the nucleic acid of interest encodes a protein that is absent or defective in said cell.
25. The method of item 23 or 24, wherein the nucleic acid of interest encodes a chimeric antigen receptor (CAR).
26. The method of any one of items 23 to 25, wherein said cell is a hematopoietic stem cell, a T cell, a
20 natural killer (NK) cell, or a B cell.
27. A method for treating a disease, condition or disorder in a subject, the method comprising administering an effective amount of the cell of item 20 or 21, or the composition of item 22, to said subject.
28. The method of item 27, wherein the disease, condition or disorder is associated with the absence of expression of a protein or the expression of a defective protein, and wherein the nucleic acid of interest
25 encodes a functional form of the protein.
29. The method of item 27, wherein the disease, condition or disorder is associated with expression of an antigen, and wherein the nucleic acid of interest encodes a recombinant receptor that specifically binds to the antigen.
30. The method of item 29, wherein the recombinant receptor is a chimeric antigen receptor (CAR).
- 30 31. The method of item 29 or 30, wherein the disease, condition or disorder is a cancer, an autoimmune or inflammatory disease, or an infectious disease.
32. The method of item 31, wherein the disease, condition or disorder is a cancer.
33. The method of item 32, wherein the cancer is a hematological cancer.
34. The method of any one of items 27 to 33, wherein said cell is a hematopoietic stem cell, a T cell,
35 a natural killer (NK) cell, or a B cell.
35. The method of any one of items 27 to 34, wherein said method comprises administering at least 1×10^2 , 1×10^3 or 1×10^4 cells to said subject.

36. The method of item 35, wherein said method comprises administering 1×10^6 to 1×10^8 cells to said subject.
37. The method of any one of items 27 to 36, wherein said cells are autologous cells.
38. The method of any one of items 27 to 36, wherein said cells are allogeneic cells.

5

Other objects, advantages and features of the present invention will become more apparent upon reading of the following non-restrictive description of specific embodiments thereof, given by way of example only with reference to the accompanying drawings.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

- 10 In the appended drawings:
- FIGs. 1A and 1B** depict the cloning strategy used to create the T-cell specific- (Tspe)-promoter from Chr16-445. History is depicted from the bottom-up.
- FIG. 2** depicts the cloning strategy used to create a plasmid to produce lentiviral particles for T_{enh} (Chr16-445). History is depicted from the bottom-up.
- 15 **FIG. 3** shows the results of *in vitro* experiments for assessing the expression pattern of GFP under the control of the T cell-specific synthetic promoter Chr16-445-minCMV. **FIG. 3A:** Jurkat (T-cell) and K562 (myeloid) cell lines were transfected with a vector coding for the GFP under a control promoter versus the synthetic T-cell specific promoter. **FIG. 3B:** PBMC transfected with a vector coding for the GFP under a control spleen focus forming virus (SFFV) promoter versus the synthetic T-cell specific promoter.
- 20 **FIG. 4** shows the results of *in vitro* experiments for assessing the expression pattern of GFP under the control of the NK cell-specific synthetic promoter (NK6, SEQ ID NO:11). Various cell lines were transfected with a vector coding for the GFP under a control promoter versus the synthetic NK-cell specific promoter.
- FIG. 5** shows the results of *in vitro* experiments aiming at determining the timing and functional
- 25 expression of GFP under a synthetic NK cell-specific (NKspe-NK8, SEQ ID NO:14) promoter. *In vitro* differentiation system allowing for maturation of CD34⁺ cells into NK cells (OP9-DL4 with NK-specific media, box on the left) or B cells (OP9, box on the right) shows that the GFP is expressed early in NK cells progeny and that it is not expressed in B cell, showing its NK cell specificity.
- FIG. 6** shows the expression of GFP in Nalm6 cell line (B cell line) when transduced with a
- 30 lentivirus coding for the GFP under the control of a B-cell specific promoter (B-enh-1, SEQ ID NO: 23, left panel), or the minimal CMV promoter sequence as a negative control (SEQ ID NO: 6, right panel).
- FIG. 7** shows the results of *in vivo* experiments for assessing the expression pattern of GFP under the control of the Chr16-445 T cell-specific synthetic promoter. *In vivo* validation of the synthetic promoter was assessed by injecting human CD34⁺ cells transduced with GFP under the control of the synthetic
- 35 promoter in a sublethally irradiated NSG mouse without (**FIG. 7A**) or with the engraftment of a human thymus (BLT model) (**FIG. 7B**). Blood analysis show that engineered-HSC can give rise to different

immune populations and that only T cells express the GFP protein, validating the specificity of our promoter. **FIG. 7C:** GFP expression in various cell types in BLT mice engrafted with CD34⁺ cells transduced with GFP under the control of a strong non-specific promoter.

FIGs. 8A-B show the results of *in vivo* experiments aiming at testing the differentiation of CD34⁺ cells modified with a GFP under the control of a NK-cell specific promoter (NK8, SEQ ID NO:14). **FIG. 8A** shows the percentage of human CD45⁺ cells that express GFP in the blood (left bars), spleen (middle bars) and bone marrow (right bars) (results from 2 humanized mice). **FIG. 8B** shows the expression of GFP in human CD45⁺ cells isolated from the bone marrow of 2 humanized mice. Dot plots show that NK cells (CD56⁺), but not B cells (CD19⁺CD3⁻) or T cells (CD3⁺CD19⁻), express the GFP when the mice were humanized with CD34⁺ transduced with the GFP under the control of the NK8-cell specific promoter (SEQ ID NO:14).

FIG. 9 shows the results of *in vivo* experiments aiming at testing the differentiation of CD34⁺ cells modified with a GFP under the control of a B-cell specific promoter (B-enh-1, SEQ ID NO: 23). GFP expression was monitored in the blood of a humanized mice 4 weeks post-humanization. Cells were gated based on the expression of hCD45⁺. Dot plots show that B cells (CD19⁺), but not monocytes (CD14⁺), express the GFP when the mice were humanized with CD34⁺ transduced with the GFP under the control of the B-cell specific promoter (SEQ ID NO: 23, middle line). Mice humanized with CD34⁺ expressing the GFP under the control of a strong and unspecific promoter (SFFV, bottom panels) show expression of GFP in all human subpopulations (hCD45⁺), while no GFP expression is observed in untransduced CD34⁺ (negative control). At this time post-humanization (week 4), no T-cell are found in the blood of mice.

FIGs. 10A-D show the results of experiments for assessing the ability of the T-cell specific promoter for expressing a functional CAR. **FIG. 10A:** CAR-CD33 expression measured by flow cytometry following transduction of primary T-cells with the CAR-CD33 construct under the control of the non-specific SFFV promoter or the T-cell specific promoter. **FIG. 10B:** Cytotoxicity against CD33⁺ or CD33⁻ AML cells of T-cells expressing CAR-CD33 under the control of the SFFV (strong) promoter or the T-cell specific promoter (Tspe) at a 2:1 ratio (no significative difference). *** $p < 0.001$. **FIG. 10C:** CAR-CD22 expressed under the Tenh Chr16-445 (Tspe) promoter induced a CAR expression strong enough to result in a similar CAR-specific cytotoxicity against RS4;11 ALL-cell line to that of SFFV (strong) promoter (ratios of 0.5:1/1:1/2:1/4:1). **FIG. 10D:** Primary T cells transduced with a CAR-GD2 under the control of the T-cell specific promoter (Chr16-445) (squares) induced a cytotoxicity against a GD2⁺ NB-cell line (SK-N-DZ), at levels similar to those of primary T cell transduced with a non-specific strong promoter (SFFV, circles). In contrast, unmodified primary T-cells (diamonds) did not kill the target cell line. **** $p < 0.0001$

FIGs. 11A-7C show the results of *in vitro* experiments aiming at determining the T cell differentiation stage at which the T-cell specific promoter is expressed. *In vitro* differentiation system allowing for maturation of CD34⁺ cell into T cells (OP9-DL4-, **FIG. 11A**) or B cells (OP9, **FIG. 11B**) shows that the CAR is expressed early In T cells differentiation process (CD1aCD7⁺ stage) and that it is not expressed in B cell, confirming its T cell specificity. **FIG. 11C** shows the percentage of expression of

the CAR-CD22 in the different sub-populations obtained in the OP9-DL4 and OP9 systems when the CAR-CD22 was expressed under the control of the T-cell specific promoter (Chr16-445, middle bars), or of a strong non-specific promoter (UCOE-SFFV, left bars). Black bars (left) depict the results obtained with untransduced cells as a negative control. DP: Double-positive.

FIG. 12 shows the results of *in vivo* experiments aiming at testing the differentiation of CD34⁺ cells transduced with a CAR-CD22 under the control of the T-cell specific promoter (Chr16-445). CAR-CD22 expression was monitored in hCD45⁺ cells of the blood of BLT mice 30 weeks post-humanization. Histogram plots shows that T cells (CD3⁺), but not B cells (CD19⁺) or monocytes (CD14⁺), express the CAR-CD22 when the mice were humanized with CD34⁺ modified with the CAR-CD22 under the control of the T-cell specific promoter (Chr16-445) (left column). This expression was not observed when the CD34⁺ were not transduced (negative control, right column).

DISCLOSURE OF INVENTION

Unless otherwise defined herein, scientific and technical terms used in connection with this disclosure shall have the meanings that are commonly understood by those of ordinary skill in the art. Further, unless otherwise required by context, singular terms shall include pluralities and plural terms shall include the singular. Generally, nomenclature used in connection with, and techniques of, cell and tissue culture, molecular biology, immunology, microbiology, genetics and protein and nucleic acid chemistry and hybridization described herein are those well-known and commonly used in the art. The methods and techniques of the disclosure are generally performed according to conventional methods well-known in the art and as described in various general and more specific references that are cited and discussed throughout the specification unless otherwise indicated. See, *e.g.* : Sambrook J. & Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); and Coligan *et al.*, Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003). Any enzymatic reactions or purification techniques are performed according to manufacturer's specifications, as commonly accomplished in the art or as described herein. The nomenclature used in connection with, and the laboratory procedures and techniques of, analytical chemistry, synthetic organic chemistry, and medicinal and pharmaceutical chemistry described herein are those well-known and commonly used in the art.

The use of the terms "a" and "an" and "the" and similar referents in the context of describing the technology (especially in the context of the claims) are to be construed to cover both the singular and the plural, unless otherwise indicated herein or clearly contradicted by context.

The terms "comprising", "having", "including", and "containing" are to be construed as open-ended terms (i.e., meaning "including, but not limited to") unless otherwise noted.

Recitation of ranges of values herein are merely intended to serve as a shorthand method of referring individually to each separate value falling within the range, unless otherwise indicated herein, and each separate value is incorporated into the specification as if it were individually recited herein. All subsets of values within the ranges are also incorporated into the specification as if they were individually recited herein.

The use of any and all examples, or exemplary language (“*e.g.*”, “*such as*”) provided herein, is intended merely to better illustrate the technology and does not pose a limitation on the scope of the claimed invention unless otherwise claimed.

No language in the specification should be construed as indicating any non-claimed element as essential to the practice of the claimed invention.

Herein, the term “about” has its ordinary meaning. The term “about” is used to indicate that a value includes an inherent variation of error for the device or the method being employed to determine the value, or encompass values close to the recited values, for example within 10% of the recited values (or range of values).

The present inventors have developed an alternative strategy to the use of traditional promoters by designing specific synthetic regulatory elements to target the expression of a gene of interest in a cell subtype-specific manner. By engineering the transduced gene to be under the control of this synthetic regulatory element, and by transducing this construct into stem cells, it has been possible to direct gene expression exclusively in a specific and targeted cell subtype (or subtypes) that derive(s) from these genetically-modified stem cells, which is a significant refinement of the actual methods. Several cell-specific transcriptional enhancer candidates have been identified. As a proof-of concept, a first “synthetic regulatory element” comprising a T cell-specific transcriptional enhancer candidate that induced the expression of the transgene specifically in the human T cell population was designed, and the same methodology was successfully applied to design other cell-specific promoters, notably two human NK cell-specific promoters and one B cell-specific promoter. The designed human T/NK/B-cell specific promoters have a reduced size and showed good specificity, and are thus amenable for use in human gene therapy and HSC engineering.

Synthetic expression cassette

Accordingly, in a first aspect, the present disclosure provides synthetic expression cassette for expressing a nucleic acid (*e.g.*, gene, gRNA, miRNA, shRNA) of interest in a cell comprising: a minimal promoter; and a transcriptional enhancer operatively coupled to the minimal promoter for expression of the nucleic acid of interest in the cell, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 70% sequence identity with at least 50 consecutive/contiguous nucleotides, preferably at least 100, 150, 200 or 250 consecutive/contiguous nucleotides, from one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47, preferably SEQ ID NOs: 7-17 and 23. In an embodiment, the transcriptional enhancer sequence comprises one or more binding sites for transcription factor(s). In an embodiment, the transcriptional

enhancer sequence comprises binding sites for at least two transcription factor(s). In an embodiment, the transcriptional enhancer sequence comprises binding sites for at least three transcription factor(s). In an embodiment, the transcriptional enhancer sequence comprises binding sites for at least four transcription factor(s). For example, the sequence set forth in SEQ ID NO:13 comprises binding sites for the transcription factors RUNX3, GATA2, FOS and JUN, and thus in an embodiment the sequence of the cell-specific transcriptional enhancer comprises 1, 2, 3 or all of these binding sites.

The term “minimal promoter” refers to a promoter that only comprises the minimal elements of a promoter, namely the TATA box (also called the Goldberg-Hogness box) and a transcription initiation site, and which is inactive (or poorly active) at inducing/driving gene expression in the absence of properly located (usually upstream) one or more regulatory elements that enhance promoter activity (transcriptional enhancers). Any minimal promoter sequence known to those of ordinary skill in the art is contemplated for inclusion in the minimal promoter sequences of the present disclosure. Minimal promoter sequences are often derived from viruses or are truncated eukaryotic promoters, and thus the minimal promoter may be a proopiomelanocortin minimal promoter (POMC), an adenoviral minimal promoter, a baculoviral minimal promoter, a CMV minimal promoter, a parvovirus minimal promoter, a herpesvirus minimal promoter, a poxvirus minimal promoter, an adeno-associated virus minimal promoter, a semiliki forest virus minimal promoter, an SV40 minimal promoter, a vaccinia virus minimal promoter, or a retrovirus minimal promoter. Examples of minimal promoters include the human simplex virus thymidine kinase (HSV TK or miniTK) minimal promoter, the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S minimal promoter, the human cytomegalovirus CMV minimal promoter (miniCMV), CMV53 (miniCMV with the addition of an upstream GC box), the minimal simian virus 40 promoter (minSV40), MLP (the –38 to +6 region of the adenovirus major late promoter), the minP (synthetic minimal promoter composed of TATA box and transcription start site – from Promega), pJB42CAT5 (a minimal promoter derived from the human *junB* gene), YB_TATA, and the super core promoter 1 (SCP1) minimal promoter (see Table I below). Several minimal promoters (also sometimes referred to as “core promoters”) are described in Ede *et al.*, *ACS Synth Biol.* 2016 May 20; 5(5): 395-404.

Table I: Sequences of representative minimal promoters

Name	Sequence
SCP1	GTACTTATATAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCCTCAGTCGCGATCGAACACT CGAGCCGAGCAGACGTGCCTACGGACCG (SEQ ID NO: 48)
miniCMV	GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGT CAGATC (SEQ ID NO: 6)
CMV53	CAACAAAATGTCGTAACAAGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATAT AAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG (SEQ ID NO:49)
minP	AGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAG (SEQ ID NO: 50)

HSV TK (miniTK)	TTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGC GACCCGCTTAA (SEQ ID NO: 51)
minSV40	TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGC CCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATCGCTGACTAATTTTTTT TATTTAT GTCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT (SEQ ID NO:52)
MLP	GGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCACTCT (SEQ ID NO:53)
pJB42CAT5	CTGACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAGCACTGGGGACTTTG AGGGTGGCCAGGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTGCTGGGAGCGGG GAACTGAGGGAAGCGACGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAGAGAA AAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCG (SEQ ID NO:54)
YB_TATA	TCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCA (SEQ ID NO:55)

Bold = TATA box consensus sequence

Underlined = consensus GC box sequence

Italics = additional B-recognition element found in pJB42CAT5

- 5 The term “enhancer” or “transcriptional enhancer” or “transcriptional regulatory element” refers to a *cis*-acting sequence that comprises one or more binding sites for transcription factors or transcriptional activators and that increases the activity of a promoter (*e.g.* a minimal promoter) in an orientation- and position-independent manner. The transcriptional enhancer may be located upstream or downstream of the minimal promoter. In an embodiment, the transcriptional enhancer is located upstream of the promoter.
- 10 In an embodiment, the transcriptional enhancer is a cell type- or subtype-specific transcriptional enhancer, *i.e.* the transcriptional enhancer specifically increases the activity of the promoter (and in turn the expression of the peptide/protein, or nucleic acid (*e.g.*, miRNA, shRNA, gRNA), of interest) in a particular cell type or subtype. The term “specifically increases” as used herein means that the increase in activity of the minimal promoter in the target cell type or subtype is higher than that in the other cell types
- 15 or subtypes. In embodiment, the transcriptional enhancer is an immune cell-specific transcriptional enhancer, *i.e.* it specifically increases the activity of the promoter in one or more immune cell type(s), such as T cells, NK cells, B cells, macrophages, dendritic cells, basophils, neutrophils, etc. In an embodiment, the immune cell-specific transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 70% sequence identity with at least 50 consecutive/contiguous nucleotides, preferably at least 100, 150, 200 or 250
- 20 consecutive/contiguous nucleotides, from one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47, preferably SEQ ID NOs: 7-17 and 23, and maintains transcriptional enhancing activity (*i.e.* exhibits transcriptional enhancing activity that is similar or better than the native sequence). In an embodiment, the immune cell-specific transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 70% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47, preferably SEQ ID NOs: 7-17 and 23, and maintains

transcriptional enhancing activity (i.e. exhibits transcriptional enhancing activity that is similar or better than the native sequence).

In further embodiments, the immune cell-specific transcriptional enhancer comprises or consists of a sequence having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity with at least 50 consecutive/contiguous nucleotides, preferably at least 100, 150, 200 or 250 consecutive/contiguous nucleotides, from one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47, preferably SEQ ID NOs: 7-17 and 23. In further embodiments, the immune cell-specific transcriptional enhancer comprises or consists of a sequence having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47, preferably SEQ ID NOs: 7-17 and 23.

In further embodiments, the immune cell-specific transcriptional enhancer comprises or consists of at least 50 consecutive/contiguous nucleotides, preferably at least 100, 150, 200 or 250 consecutive/contiguous residues, from one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47, preferably SEQ ID NOs: 7-17 and 23.

Some of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47 comprise repetitive domains/motifs. For example, the sequence set forth in SEQ ID NO: 7 comprises a repetitive domain/motif of about 50 nucleotides (sequence: GGTGTGGAGGGCCGGGTGGTGACX¹CTX²AGTGACAGGTGAGGATGTGGCAX³ (SEQ ID NO: 63), wherein X¹ is G or A, preferably G; X² is G or C, preferably G, and X³ is C or T, preferably C. In an embodiment, the cell-specific transcriptional enhancer comprises at least one, preferably at least 2, 3, 4, 5, 6, 7, or 8 repetitive domains/motifs.

In an embodiment, the synthetic expression cassette is for expressing the nucleic acid of interest in a T cell, and the transcriptional enhancer comprises or consists of a sequence having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-10, 13, 14, 18-22, 24-31, 33-43, 45 and 47, preferably SEQ ID NOs: 7-10, 13, 14. In a further embodiment, the synthetic expression cassette is for expressing the nucleic acid of interest in a T cell, and the transcriptional enhancer comprises or consists of a sequence having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7, 9, 27, 33, 34, 36, 37, 42, 43 and 45, preferably SEQ ID NOs: 7 and 9. In an embodiment, the cell is a CD4⁺ cells and the transcriptional enhancer comprises or consists of a sequence having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 22, 34, 37, 38, 43, 45 and 47.

In an embodiment, the synthetic expression cassette is for expressing the nucleic acid of interest in an NK cell, and the transcriptional enhancer comprises or consists of a sequence having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 8, 10-14, 18-22, 24-26, 28-31, 35, 38-41, 44 and 47, preferably SEQ ID NOs: 11, 12 and 14.

In an embodiment, the synthetic expression cassette is for expressing the nucleic acid of interest in NK and T cells, and the transcriptional enhancer comprises or consists of a sequence having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity with the sequence set forth in SEQ ID NOs: 8, 10, 13, 14, 18-21, 22, 24-26, 28-31, 35, 38, 39-41 and 47, preferably SEQ ID NOs: 8, 10, 13 and 14.

In an embodiment, the synthetic expression cassette is for expressing the nucleic acid of interest in B cells, and the transcriptional enhancer comprises or consists of a sequence having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 15-17, 23, 32, 44 and 46, preferably SEQ ID NOs: 15-17 and 23, and more preferably SEQ ID NO: 23.

In an embodiment, the synthetic expression cassette is for expressing the nucleic acid of interest in B and NK cells, and the transcriptional enhancer comprises or consists of a sequence having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NO: 44.

In an embodiment, the synthetic expression cassette is for expressing the nucleic acid of interest in immune cells, such as NK cells, T cells, basophils and monocytes/macrophages, and the transcriptional enhancer comprises or consists of a sequence having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity with the sequence set forth in SEQ ID NO: 14.

In an embodiment, the cell is a CD4⁺ cells (e.g., a CD4⁺ T cell) and the transcriptional enhancer comprises or consists of a sequence having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 22, 34, 37, 38, 43, 45 and 47.

In another embodiment, the cell is a CD8⁺ cells (e.g., a CD8⁺ T cell) and the transcriptional enhancer comprises or consists of a sequence having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity with one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 33, 35 and 39-41.

Sequence identity between two nucleotide sequences may be determined by comparing each position in the aligned sequences. A degree of identity between nucleotide sequences is a function of the number of identical nucleotides at positions shared by the sequences. As used herein, a given percentage of identity between sequences denotes the degree of sequence identity in optimally aligned sequences. Optimal alignment of sequences for comparisons of identity may be conducted using a variety of algorithms and sequence alignment tools, such as the local homology algorithm of Smith and Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math* 2: 482, the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* **48**: 443, the search for similarity method of Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444, and the computerised implementations of these algorithms (such as GAP, BESTFIT, FASTA and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, WI, U.S.A.). Sequence identity may also be determined using the BLAST algorithm, described in Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* **215**: 403-10 (using the published default settings). Software/tools for performing BLAST analysis may be available through the National Center for Biotechnology Information. Other sequence alignment

tools such as Needle, Stretcher, Clustal Omega and Kalign are available through the European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI).

The terms “operatively positioned”, “operatively linked” and “operatively coupled” mean that a promoter (and/or enhancer) is in a correct functional location and orientation in relation to a nucleic acid sequence to control transcriptional initiation and expression of that nucleic acid. An enhancer is “operatively coupled” to a promoter (*e.g.* a minimal promoter) when it is in a correct functional location and orientation for increasing the transcriptional activity of the promoter.

The terms “synthetic” mean that the expression cassette is an artificial or recombinant construct that is not found in nature, *i.e.* that the combination of the minimal promoter and the transcriptional enhancer is not naturally found in the native genome of a cell. In an embodiment, the minimal promoter is heterologous with the transcriptional enhancer, *i.e.* it is not normally associated with the transcriptional enhancer in its natural environment, *e.g.*, they do not control the expression of the same genes in the native genome of a cell. In an embodiment, the minimal promoter and the transcriptional enhancer are from different cell types or from different organisms (*e.g.*, virus *vs.* eukaryotic cell). In an embodiment, the minimal promoter and/or the transcriptional enhancer is/are heterologous with the nucleic acid of interest, *i.e.* they are not normally associated with the nucleic acid of interest in its natural environment. In an embodiment, the transcriptional enhancer is of human origin. In an embodiment, the minimal promoter is of viral origin.

In an embodiment, the synthetic expression cassette further comprises a polyadenylation (poly(A)) signal. The poly(A) signal effects proper polyadenylation of the nucleic acid of interest (transcript). The nature of the poly(A) signal not believed to be crucial to the successful practice of the invention, and thus any such sequence may be employed. Examples of representative poly(A) signals include the SV40 poly(A) signal and/or the bovine growth hormone poly(A) signal, convenient and/or known to function well in various target cells. In an embodiment, the synthetic expression cassette further comprises a Woodchuck Hepatitis Virus (WHP) Posttranscriptional Regulatory Element (WPRE). Such element is commonly used to increase expression of genes delivered by viral vectors, has been shown to increase mRNA stability and protein yield (see, *e.g.*, Lee, YB, *et al.* 2005. *Exp Physiol.* **90**(1): 33-7). In an embodiment, the WPRE is used in combination with the poly(A) signal. In another embodiment, the WPRE replaces the poly(A) signal.

In an embodiment, the synthetic expression cassette further comprises a transcriptional termination signal. A “termination signal” or “terminator” is comprised of the DNA sequences involved in specific termination of an RNA transcript by an RNA polymerase. Thus, in certain embodiments, a termination signal that ends the production of an RNA transcript is contemplated.

In an embodiment, the synthetic expression cassette further comprises a nucleic acid of interest. The term “nucleic acid of interest” or “gene of interest” is used to refer to a nucleic acid that encodes a functional peptide or polypeptide (protein) of interest (native or modified peptides/proteins). In an embodiment, the functional peptide or polypeptide is a therapeutic peptide or polypeptide, *i.e.* a peptide or

polypeptide that can be administered to a subject for the purpose of treating or preventing a disease. Any nucleic acid encoding a peptide or polypeptide of interest known to those of ordinary skill in the art is contemplated for inclusion in the synthetic expression cassette. The peptide or polypeptide of interest may be an enzyme, a signaling molecule (*e.g.*, kinase, phosphatase), a receptor, a growth factor (*e.g.*, cytokines), a chemotactic protein (*e.g.*, chemokines), a structural protein (cytoskeletal proteins), a transcription factor, a cell adhesion protein, an antibody or antigen-binding fragment thereof, etc. The peptide or polypeptide may be a naturally-occurring peptide or polypeptide, a fragment or variant thereof, chimeric versions thereof, etc.

In an embodiment, the nucleic acid of interest encodes a recombinant receptor, such as a chimeric antigen receptor (CAR). Such CAR typically comprises a ligand-binding domain (*e.g.* antibody or antibody fragment such as a single-chain variable fragment (scFv)) that provides specificity for a desired antigen (*e.g.*, tumor antigen) linked to an activating intracellular domain portion, such as a T cell or NK cell activating domain, providing a primary activation signal, in some aspects via linkers and/or transmembrane domain(s).

In particular embodiments, the recombinant receptor (*e.g.*, CAR) comprises an intracellular signaling domain, which includes an activating cytoplasmic signaling domain (also interchangeably called an intracellular signaling region), such as an activating cytoplasmic (intracellular) domain capable of inducing a primary activation signal in an immune cell (T cell, NK cell, for example), a cytoplasmic signaling domain of a T cell receptor (TCR) component (*e.g.* a cytoplasmic signaling domain of a CD3-zeta (CD3 ζ) chain or a functional variant or signaling portion thereof) and/or that comprises an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM).

In some embodiments, the recombinant receptor (*e.g.*, CAR) further comprises an extracellular ligand-binding domain that specifically binds to a ligand (*e.g.*, antigen) antigen. In some embodiments, the ligand, such as an antigen, is a protein expressed on the surface of cells. In some embodiments, the CAR is a TCR-like CAR and the antigen is a processed peptide antigen, such as a peptide antigen of an intracellular protein, which is recognized on the cell surface in the context of a major histocompatibility complex (MHC) molecule.

Exemplary recombinant receptors, including CARs and recombinant TCRs, as well as methods for engineering and introducing the receptors into cells, include those described, for example, in international patent application publication numbers WO 2000/14257, WO 2013/126726, WO 2012/129514, WO 2014/031687, WO 2013/166321, WO 2013/071154, WO 2013/123061, US patent application publication numbers US 2002/131960, US 2013/287748, US 2013/0149337, US Patent Nos.: 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353, and 8,479,118, and European patent application number EP2537416, and/or those described by Sadelain *et al.*, *Cancer Discov.* 2013 April; **3**(4): 388-398; Davila *et al.* (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* 2012 October; **24**(5): 633-39; Wu *et al.*, *Cancer*, 2012 March **18**(2): 160-75. In some embodiments, the genetically engineered antigen receptors

include a CAR as described in US Patent No.: 7,446,190, and those described in International Patent Application Publication No.: WO 2014/055668.

In some embodiments, the recombinant receptor (*e.g.* CAR) includes in its extracellular portion an antigen- or ligand-binding domain that binds (specifically binds) to an antigen (or a ligand), such as one or more antigen-binding fragment, domain, or portion, or one or more antibody variable domains, and/or antibody molecules. In some embodiments, the CAR includes an antigen-binding portion or portions of an antibody molecule, such as a single-chain antibody fragment (scFv) derived from the variable heavy (V_H) and variable light (V_L) chains of a monoclonal antibody (mAb). The term "antibody" herein is used in the broadest sense and includes polyclonal and monoclonal antibodies, including intact antibodies and functional (antigen-binding) antibody fragments, including fragment antigen binding (Fab) fragments, $F(ab')_2$ fragments, Fab' fragments, Fv fragments, recombinant IgG (rlgG) fragments, variable heavy chain (V_H) regions capable of specifically binding the antigen, single chain antibody fragments, including single chain variable fragments (scFv), and single domain antibodies (*e.g.*, sdAb, sdFv, nanobody) fragments. The term encompasses genetically engineered and/or otherwise modified forms of immunoglobulins, such as intrabodies, peptibodies, chimeric antibodies, fully human antibodies, humanized antibodies, and heteroconjugate antibodies, multispecific, *e.g.*, bispecific, antibodies, diabodies, triabodies, and tetrabodies, tandem di-scFv, tandem tri-scFv. Unless otherwise stated, the term "antibody" should be understood to encompass functional antibody fragments thereof. The term also encompasses intact or full-length antibodies, including antibodies of any class or sub-class, including IgG and sub-classes thereof, IgM, IgE, IgA, and IgD.

In some embodiments, the antigen-binding proteins, antibodies and antigen binding fragments thereof specifically recognize an antigen of a full-length antibody. In some embodiments, the heavy and light chains of an antibody can be full-length or can be an antigen-binding portion (a Fab, $F(ab')_2$, Fv or a single chain Fv fragment (scFv)). In other embodiments, the antibody heavy chain constant region is chosen from, *e.g.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, and IgE, particularly chosen from, *e.g.*, IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4, more particularly, IgG1 (*e.g.*, human IgG1). In another embodiment, the antibody light chain constant region is chosen from, *e.g.*, kappa or lambda, particularly kappa.

The term "variable region" or "variable domain" refers to the domain of an antibody heavy or light chain that is involved in binding the antibody to antigen. The variable domains of the heavy chain and light chain (V_H and V_L , respectively) of a native antibody generally have similar structures, with each domain comprising four conserved framework regions (FRs) and three CDRs. (See, *e.g.*, Kindt *et al.* *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007). A single V_H or V_L domain may be sufficient to confer antigen-binding specificity. Furthermore, antibodies that bind a particular antigen may be isolated using a V_H or V_L domain from an antibody that binds the antigen to screen a library of complementary V_L or V_H domains, respectively. See, *e.g.*, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* **150**:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* **352**: 624-628 (1991).

Single-domain antibodies (sdAbs) are antibody fragments comprising all or a portion of the heavy chain variable domain or all or a portion of the light chain variable domain of an antibody. In certain embodiments, the single-domain antibody is a human single-domain antibody.

Antibody fragments can be made by various techniques, including but not limited to proteolytic digestion of an intact antibody as well as production by recombinant host cells. In some embodiments, the antibodies are recombinantly-produced fragments, such as fragments comprising arrangements that do not occur naturally, such as those with two or more antibody regions or chains joined by synthetic linkers, *e.g.*, peptide linkers, and/or that are may not be produced by enzyme digestion of a naturally-occurring intact antibody. In some embodiments, the antibody fragment is a scFv.

A "humanized" antibody is an antibody in which all or substantially all CDR amino acid residues are derived from non-human CDRs and all or substantially all FR amino acid residues are derived from human FRs. A humanized antibody optionally may include at least a portion of an antibody constant region derived from a human antibody. A "humanized form" of a non-human antibody, refers to a variant of the non-human antibody that has undergone humanization, typically to reduce immunogenicity to humans, while retaining the specificity and affinity of the parental non-human antibody. In some embodiments, some FR residues in a humanized antibody are substituted with corresponding residues from a non-human antibody (*e.g.*, the antibody from which the CDR residues are derived), *e.g.*, to restore or improve antibody specificity or affinity.

In some embodiments, the CAR comprises an antibody or an antigen-binding fragment (*e.g.*, scFv) that specifically recognizes an antigen, such as an intact antigen, expressed on the surface of a cell.

In some embodiments, the CAR comprises a TCR-like antibody, such as an antibody or an antigen-binding fragment (*e.g.*, scFv) that specifically recognizes an intracellular antigen, such as a tumor-associated antigen, presented on the cell surface as a MHC-peptide complex. In some embodiments, an antibody or antigen-binding portion thereof that recognizes an MHC-peptide complex can be expressed on cells as part of a recombinant receptor, such as an antigen receptor. Among the antigen receptors are functional non-TCR antigen receptors, such as chimeric antigen receptors (CARs). Generally, a CAR comprising an antibody or antigen-binding fragment that exhibits TCR-like specificity directed against peptide-MHC complexes also may be referred to as a TCR-like CAR.

In some embodiments, the recombinant receptors include recombinant T cell receptors (TCRs) and/or TCRs cloned from naturally occurring T cells. In some embodiments, a T cell receptor (TCR) comprises a variable α and β chains (also known as TCR α and TCR β , respectively) or a variable γ and δ chains (also known as TCR γ and TCR δ , respectively), or a functional fragment thereof such that the molecule is capable of specifically binding to an antigen peptide bound to a MHC receptor. In some embodiments, the TCR is in the $\alpha\beta$ form. Typically, TCRs that exist in $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ forms are generally structurally similar, but T cells expressing them may have distinct anatomical locations or functions. A TCR can be found on the surface of a cell or in soluble form. Generally, a TCR is found on the surface of T cells (or T lymphocytes) where it is generally responsible for recognizing antigens bound to MHC

molecules. In some embodiments, a TCR also can comprise a constant domain, a transmembrane domain and/or a short cytoplasmic tail (see, *e.g.*, Janeway *et al.*, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). For example, in some embodiments, each chain of the TCR can possess one N-terminal immunoglobulin variable domain, one immunoglobulin constant domain, a transmembrane region, and a short cytoplasmic tail at the C-terminal end. In some embodiments, a TCR is associated with invariant proteins of the CD3 complex involved in mediating signal transduction.

In some embodiments, a TCR for a target antigen (*e.g.*, a cancer/tumor antigen) is identified and introduced into the cells. In some embodiments, nucleic acid encoding the TCR can be obtained from a variety of sources, such as by polymerase chain reaction (PCR) amplification of publicly available TCR DNA sequences. In some embodiments, the TCR is obtained from a biological source, such as from cells, such as from a T cell (*e.g.*, cytotoxic T cell), T cell hybridomas or other publicly available source. In some embodiments, the T-cells can be obtained from *in vivo* isolated cells. In some embodiments, a high-affinity T cell clone can be isolated from a patient and the TCR isolated. In some embodiments, the T cells can be a cultured T cell hybridoma or clone. In some embodiments, the TCR clone for a target antigen has been generated in transgenic mice engineered with human immune system genes (*e.g.*, the human leukocyte antigen system, or HLA). See, *e.g.*, tumor antigens (see, *e.g.*, Parkhurst *et al.* (2009) *Clin Cancer Res.* **15**: 169-180 and Cohen *et al.* (2005) *J Immunol.* **175**:5799-5808. In some embodiments, phage display is used to isolate TCRs against a target antigen (see, *e.g.*, Varela-Rohena *et al.* (2008) *Nat Med.* **14**: 1390-1395 and Li (2005) *Nat Biotechnol.* **23**:349-354. In some embodiments, the TCR or antigen-binding portion thereof can be synthetically generated from knowledge of the sequence of the TCR of interest.

In some embodiments, the recombinant receptor (*e.g.*, a CAR such as an antibody or antigen-binding fragment thereof), further includes a spacer, which may be or include at least a portion of an immunoglobulin constant region or variant or modified version thereof, such as a hinge region, *e.g.*, an IgG4 hinge region, and/or a CH1/CL and/or Fc region. In some embodiments, the constant region or portion is of a human IgG, such as IgG4 or IgG1. In some aspects, the portion of the constant region serves as a spacer region between the antigen-recognition component, *e.g.*, scFv, and transmembrane domain. The spacer can be of a length that provides for increased responsiveness of the cell following antigen binding, as compared to in the absence of the spacer. Exemplary spacers include those having at least about 10 to 220 amino acids, about 10 to 200 amino acids, about 10 to 175 amino acids, about 10 to 150 amino acids, about 10 to 125 amino acids, about 10 to 100 amino acids, about 10 to 75 amino acids, about 10 to 50 amino acids, about 10 to 40 amino acids, about 10 to 30 amino acids, about 10 to 20 amino acids, or about 10 to 15 amino acids, and including any integer between the endpoints of any of the listed ranges. Exemplary spacers include IgG4 hinge alone, IgG4 hinge linked to CH2 and CH3 domains, or IgG4 hinge linked to the CH3 domain. Exemplary spacers include, but are not limited to, those described in Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, **19**:3153 or PCT patent publication number WO 2014/031687.

The antigen/ligand recognition domain generally is linked to one or more intracellular signaling components, such as signaling components that mimic activation through an antigen receptor complex, such as a TCR or NK receptor complex, in the case of a CAR, and/or signal via another cell surface receptor. Thus, in some embodiments, the antigen-binding component (*e.g.*, antibody) is linked to one or more transmembrane and intracellular signaling domains. In some embodiments, the transmembrane domain is fused to the extracellular domain. In one embodiment, a transmembrane domain that naturally is associated with one of the domains in the receptor, *e.g.*, CAR, is used. In some instances, the transmembrane domain is selected or modified by amino acid substitution to avoid binding of such domains to the transmembrane domains of the same or different surface membrane proteins to minimize interactions with other members of the receptor complex.

The transmembrane domain in some embodiments is derived either from a natural or from a synthetic source. Where the source is natural, the domain in some aspects is derived from any membrane-bound or transmembrane protein. Transmembrane regions include those derived from (*i.e.* comprise at least the transmembrane region(s) of) the alpha, beta or zeta chain of the TCR, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Alternatively, the transmembrane domain in some embodiments is synthetic. In some aspects, the synthetic transmembrane domain comprises predominantly hydrophobic residues such as leucine and valine. In some aspects, a triplet of phenylalanine, tryptophan and valine will be found at each end of a synthetic transmembrane domain.

Among the intracellular signaling domains are those that mimic or approximate a signal through a natural antigen receptor, a signal through such a receptor in combination with a costimulatory receptor, and/or a signal through a costimulatory receptor alone. In some embodiments, a short oligo- or polypeptide linker, for example, a linker of between 2 and 10 amino acids in length, such as one comprising glycines and serines, *e.g.*, glycine- serine doublet, is present and forms a linkage between the transmembrane domain and the cytoplasmic signaling domain of the CAR.

The receptor, *e.g.*, the CAR, generally includes at least one intracellular signaling component or components. In some embodiments, the receptor includes an intracellular component of a TCR complex, such as a TCR CD3 chain that mediates T-cell activation and cytotoxicity, *e.g.*, CD3 ζ chain. Thus, in some aspects, the CAR is linked to one or more cell signaling modules. In some embodiments, cell signaling modules include CD3 transmembrane domain, CD3 intracellular signaling domains, and/or other CD transmembrane domains. In some embodiments, the receptor, *e.g.*, CAR, further includes a portion of one or more additional molecules such as Fc receptor γ , CD8, CD4, CD25, or CD16. In some aspects, the CAR includes a primary cytoplasmic signaling sequence that regulates primary activation of the TCR complex. Primary cytoplasmic signaling sequences that act in a stimulatory manner may comprise signaling motifs which are known as immunoreceptor tyrosine-based activation motifs or ITAMs. Examples of ITAM comprising primary cytoplasmic signaling sequences include those derived from TCR or CD3 ζ , FcR gamma or FcR beta. In some embodiments, cytoplasmic signaling molecule(s) in the CAR comprise(s) a

cytoplasmic signaling domain, portion thereof, or sequence derived from CD3 ζ . in some embodiments, to promote full activation, a component for generating a secondary or co-stimulatory signal is also included in the CAR, such as the signaling domain of a costimulatory receptor such as CD28, 4-1BB, OX40, DAP10, and ICOS. In some aspects, an additional CAR is expressed in the same cell and provides the component
5 for generating the secondary or costimulatory signal. In some cases, CARs are referred to as first, second, and/or third generation CARs. In some aspects, a first-generation CAR is one that solely provides an antigen-receptor (*e.g.*, CD3-chain) induced signal upon antigen binding; in some aspects, a second-generation CARs is one that provides such a signal and costimulatory signal, such as one including an intracellular signaling domain from a costimulatory receptor such as CD28 or CD137; in some aspects, a
10 third generation CAR in some aspects is one that includes multiple costimulatory domains of different costimulatory receptors.

In some embodiments, the CAR or other antigen receptor may further include a marker or the cell may further express a marker, such as a surrogate marker, which may be used to confirm transduction or engineering of the cell to express the receptor, such as a truncated version of a cell surface receptor, such
15 as truncated EGFR (tEGFR). In some aspects, the marker includes all or part (*e.g.*, truncated form) of CD34, a NGFR, or epidermal growth factor receptor (*e.g.*, tEGFR). In some embodiments, the nucleic acid encoding the marker is operably linked to a polynucleotide encoding for a linker sequence, such as a cleavable linker sequence, *e.g.*, T2A. See WO 2014/031687. In some embodiments, introduction of a construct encoding the CAR and EGFRt separated by a T2A ribosome switch can express two proteins
20 from the same construct, such that the EGFRt can be used as a marker to detect cells expressing such construct. In some embodiments, a marker, and optionally a linker sequence, can be any as disclosed in published patent application No. WO 2014/031687. For example, the marker can be a truncated EGFR (tEGFR) that is, optionally, linked to a linker sequence, such as a T2A cleavable linker sequence.

Among the antigens that may be targeted by the chimeric receptors are those expressed in the
25 context of a disease, condition, or cell type to be targeted via the adoptive cell therapy. Among the diseases and conditions are proliferative, neoplastic, and malignant diseases and disorders, including cancers and tumors, including hematologic cancers, cancers of the immune system, such as lymphomas, leukemias, and/or myelomas (*e.g.*, B cell, T cell, and myeloid leukemias, lymphomas, and multiple myelomas).

In some embodiments, the antigen (or a ligand) is a polypeptide. In some embodiments, it is a
30 carbohydrate or other molecule. In some embodiments, the antigen (or a ligand) is selectively expressed or overexpressed on cells of the disease or condition, *e.g.*, the tumor/cancer or pathogenic cells, as compared to normal or non-targeted cells or tissues. In other embodiments, the antigen is expressed on normal cells and/or is expressed on the engineered cells.

In some embodiments, the antigen (or a ligand) is a tumor antigen or cancer marker. In certain
35 embodiments, the antigen is an integrin (*e.g.*, $\alpha_v\beta_6$ integrin, $\alpha_v\beta_3$ integrin, integrin β_7), B cell maturation antigen (BCMA), B7-H6, carbonic anhydrase 9 (CA9, also known as CAIX or G250), a cancer-testis antigen, cancer/testis antigen IB (CTAG, also known as NY-ESO-1 and LAGE-2), carcinoembryonic

antigen (CEA), a cyclin, cyclin A2, C-C Motif Chemokine Ligand 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, epidermal growth factor protein (EGFR), truncated epidermal growth factor protein (tEGFR), type III epidermal growth factor receptor mutation (EGFR vIII), epithelial glycoprotein 2 (EPG-2), epithelial glycoprotein 40 (EPG-40),
 5 ephrinB2, ephrin receptor A2 (EPHa2), estrogen receptor, Fc receptor like 5 (FCRL5; also known as Fc receptor homolog 5 or FCRH5), fetal acetylcholine receptor (fetal AchR), a folate binding protein (FBP), folate receptor alpha, fetal acetylcholine receptor, ganglioside GD2, O-acetylated GD2 (OGD2), ganglioside GD3, glycoprotein 100 (gp100), Her2/neu (receptor tyrosine kinase erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), erbB dimers, Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA),
 10 hepatitis B surface antigen, Human leukocyte antigen A1 (HLA-A1), Human leukocyte antigen A2 (HLA-A2), IL-22 receptor alpha (IL-22R α), IL-13 receptor alpha 2 (IL-13R α 2), kinase insert domain receptor (kdr), kappa light chain, L1 cell adhesion molecule (L1CAM), CE7 epitope of L1-CAM, Leucine Rich Repeat Containing 8 Family Member A (LRRC8A), Lewis Y, Melanoma-associated antigen (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesothelin, c-Met, murine cytomegalovirus (CMV), mucin 1 (MUC1), MUC 16,
 15 natural killer group 2 member D (NKG2D) ligands, melan A (MART-1), neural cell adhesion molecule (NCAM), oncofetal antigen, Preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME), progesterone receptor, a prostate specific antigen, prostate stem cell antigen (PSCA), prostate specific membrane antigen (PSMA), Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 1 (ROR1), survivin, Trophoblast glycoprotein (TPBG also known as 5T4), tumor-associated glycoprotein 72 (TAG72), vascular endothelial growth factor
 20 receptor (VEGFR), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), Wilms Tumor 1 (WT-1), galectins (galectin-1, galectin-7) a pathogen-specific antigen, or an antigen associated with a universal tag, and/or biotinylated molecules, and/or molecules expressed by HIV, HCV, HBV or other pathogens such as bacteria and parasites. Antigens targeted by the receptors in some embodiments include antigens associated with a B cell malignancy, such as any of a number of known B cell marker. In some embodiments, the
 25 antigen targeted by the receptor is CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b or CD30. In an embodiment, a plurality of recombinant receptors targeting a plurality of antigens are used. In a further embodiment, two recombinant receptors targeting two antigens are used.

30 Vector/plasmids

In an embodiment, the synthetic expression cassette is comprised in a plasmid or a vector. Thus, the present disclosure also relates to a vector or plasmid comprising the synthetic expression cassette described herein. The term "vector" is used to refer to a carrier into which a nucleic acid (*e.g.*, the synthetic expression cassette defined herein) can be inserted for introduction into a cell where it can be replicated.
 35 The term "expression vector" or "nucleic acid vector" refers to a vector containing a nucleic acid or "expression cassette" coding for at least part of a gene product capable of being transcribed and "regulatory" or "control" sequences, which refer to nucleic acid sequences necessary for the transcription and possibly

translation of an operably linked coding sequence in a particular host cell. In addition to control sequences that govern transcription and translation, expression vectors may contain nucleic acid sequences that serve other functions as well.

5 In an embodiment, the vector further comprises a nucleic acid encoding a selectable marker or reporter protein. A selectable marker or reporter is defined herein to refer to a nucleic acid encoding a polypeptide that, when expressed, confers an identifiable characteristic (*e.g.*, a detectable signal, resistance to a selective agent) to the cell permitting easy identification, isolation and/or selection of cells containing the selectable marker from cells without the selectable marker or reporter. Any selectable marker or reporter known to those of ordinary skill in the art is contemplated for inclusion as a selectable marker in the vector
10 of the present disclosure. For example, the selectable marker may be a drug selection marker, an enzyme, or an immunologic marker. Examples of selectable markers or reporters include, but are not limited to, polypeptides conferring drug resistance (*e.g.*, kanamycin/geneticin resistance), enzymes such as alkaline phosphatase and thymidine kinase, bioluminescent and fluorescent proteins such as luciferase, green fluorescent protein (GFP), yellow fluorescent protein (YFP), cyan fluorescent protein (CFP), blue
15 fluorescent protein (BFP), citrine and red fluorescent protein from discosoma (dsRED), membrane bound proteins to which high affinity antibodies or ligands directed thereto exist or can be produced by conventional means, and fusion proteins comprising a membrane-bound protein appropriately fused to an antigen tag domain from, among others, hemagglutinin (HA) or Myc. The nucleic acid encoding the selectable marker or reporter protein may be under the control of the same promoter/enhancer as the nucleic
20 acid of interest, or may be under the control of a distinct promoter/enhancer.

In embodiments, the vector may comprise additional elements, such as one or more origins of replication sites (often termed "ori"), restriction endonuclease recognition sites (multiple cloning sites, MCS) and/or internal ribosome entry site (IRES) elements.

In an embodiment, the vector is a viral vector. The term "viral vector" as used herein refers to a
25 recombinant virus capable of transducing cells and introducing their genetic material into the cells. In an embodiment, the viral vector is suitable for use in gene therapy applications. Examples of viral vectors that may be used in gene therapy include retroviruses (lentiviruses), adenoviruses, adeno-associated viruses (AAV), herpesviruses (herpes simplex viruses), alphaviruses, and vaccinia viruses (Poxviruses). In an embodiment, the viral vector is a lentiviral vector. As will be evident to one of skill in the art, the term
30 "lentiviral vector" is used to refer to a lentiviral particle that mediates nucleic acid transfer. Lentiviral particles will typically include various viral components and sometimes also host cell components in addition to nucleic acid(s). In particular aspects, the terms "lentiviral vector," "lentiviral expression vector" are used to refer to lentiviral transfer plasmids and/or infectious lentiviral particles.

In an embodiment, the lentiviral vector is a pseudotyped lentiviral vector. Pseudotyped lentiviral
35 vectors consist of vector particles bearing enveloped proteins (glycoproteins, GP) derived from other enveloped viruses. Such particles possess the tropism of the virus from which the enveloped proteins are derived. One of the widely used glycoproteins for pseudotyping lentiviral vectors is the vesicular stomatitis

virus GP (VSV-G), due to the very broad tropism and stability of the resulting pseudotypes. Pseudotyped lentiviral vectors are well known in the art, and several examples are described, for example, in Cronin *et al.*, Curr. Gene Ther. 5(4):387-398. It includes lentiviral vectors pseudotyped with lyssavirus GPs, lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) GPs, alphavirus GPs (*e.g.*, Ross River virus (RRV), Semliki Forest virus (SFV) and Sindbis virus GPs), Filovirus GPs (*e.g.*, Marburg virus and Ebola Zaire virus GPs), gammaretrovirus GPs (*e.g.*, ecotropic MLV, amphotropic 4070A MLV, 10A1 MLV, xenotropic NZB MLV, mink cell focus-forming virus, gibbon ape leukemia (GALV) virus, RD1 14 GPs), Vesicular Stomatitis Virus type-G (VSV-G), Measles-Virus Lentiviral vector (MV-LV), Baboon envelop (BaEV)-LVs and baculovirus GPs (GP64).

In an embodiment, the vector is an episomally-maintained viral vector or non-integrating vector, such as a Sendai virus or vector. Such vectors are not integrated into the genome, but are maintained episomally with cell division due to scaffold/matrix attachment region presence inside vector (see, *e.g.*, Giannakopoulos A *et al.*, *J Mol Biol.* 2009 Apr 17; **387**(5):1239-49; and Haase *et al.*, *BMC Biotechnol.* 2010; **10**: 20).

In another embodiment, the vector is a non-viral vector, for example nude DNA, a liposome, a polymerizer or a molecular conjugate.

Cells

In another aspect, the present disclosure provides a cell (host cell, engineered cell) comprising the synthetic expression cassette or vector/plasmid described herein. In an embodiment, the cell is a primary cell, for example a brain/neuronal cell, a peripheral blood cell (*e.g.*, a B or T lymphocyte, a monocyte, a NK cell), a cord blood cell, a bone marrow cell, a cardiac cell, an endothelial cell, an epidermal cell, an epithelial cell, a fibroblast, hepatic cell or a lung/pulmonary cell. In an embodiment, the cell is a bone marrow cell, peripheral blood cell or cord blood cell. In a further embodiment, the cell is an immune cell, such as a T cell (*e.g.*, a CD8⁺ T cell), a B cell or a NK cell.

In an embodiment, the cell is a stem cell. The term "stem cell" as used herein refers to a cell that has pluripotency which allows it to differentiate into a functional mature cell. It includes primitive hematopoietic cells, progenitor cells, as well as adult stem cells that are undifferentiated cells found in various tissue within the human body, which can renew themselves and give rise to specialized cell types and tissue from which the cells came (*e.g.*, muscle stem cells, skin stem cells, brain or neural stem cells, mesenchymal stem cell, lung stem cells, liver stem cells).

In an embodiment, the cell is a primitive hematopoietic cell. As used herein, the term "primitive hematopoietic cell" is used to refers to cells having pluripotency which allows them to differentiate into functional mature blood cells of the myeloid and lymphoid lineages such as T cells, B cells, NK cells, granulocytes (*e.g.*, promyelocytes, neutrophils, eosinophils, basophils), erythrocytes (*e.g.*, reticulocytes, erythrocytes), thrombocytes (*e.g.*, megakaryoblasts, platelet producing megakaryocytes, platelets), and monocytes (*e.g.*, monocytes, macrophages), and that may or may not the ability to regenerate while

maintaining their pluripotency (self-renewal). It encompasses "hematopoietic stem cells" or "HSCs", which are cells having both pluripotency which allows them to differentiate into functional mature cells such as granulocytes, erythrocytes, thrombocytes, and monocytes, and the ability to regenerate while maintaining their pluripotency (self-renewal), as well as pluripotent hematopoietic cells that do not have self-renewal capacity. It also encompasses embryonic stem cells (ESCs), which are pluripotent stem cells derived from the inner cell mass of a blastocyst, an early-stage pre-implantation embryo. In an embodiment, the population of cells comprises ESCs. In another embodiment, the population of cells comprises HSCs. HSCs may be obtained from the body or an organ of the body containing cells of hematopoietic origin. Such sources include un-fractionated bone marrow (from femurs, hip, ribs, sternum, and other bones), umbilical cord blood, peripheral blood, liver, thymus, lymph and spleen. All of the aforementioned crude or un-fractionated blood products can be enriched for cells having HSC characteristics in ways known to those of skill in the art. HSCs are phenotypically identified by their small size, lack of lineage (lin) markers, low staining (side population) with vital dyes such as rhodamine 123 (rhodamine^{DULL}, also called rho⁰) or Hoechst 33342, and presence/absence of various antigenic markers on their surface many of which belongs to the cluster of differentiation series, such as: CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45 and c-kit.

In an embodiment, the stem cell is an induced pluripotent stem cell (iPSC). The term iPSC refers to a pluripotent stem cell that can be generated directly from adult cells using appropriate factors to "reprogram" the cells.

In an embodiment, the cell is a mammalian cell, for example a human cell.

The synthetic expression cassette or vector/plasmid described herein may be introduced into the cell using standard techniques for introducing nucleic acids into a cell, *e.g.*, transfection, transduction or transformation. In an embodiment, the vector is a viral vector, and the cell is transduced with the vector. As used herein, the term "transduction" refers to the stable transfer of genetic material from a viral particle (*e.g.*, lentiviral) to a cell genome (*e.g.*, hematopoietic cell genome). It also encompasses the introduction of non-integrating viral vectors into cells, which leads to the transient or episomal expression of the gene of interest present in the viral vector.

Viruses may be used to infect cells *in vivo*, *ex vivo*, or *in vitro* using techniques well known in the art. For example, when cells, for instance CD34⁺ cells or stem cells are transduced *ex vivo*, the vector particles may be incubated with the cells using a dose generally in the order of between 1 to 100 or 1 to 50 multiplicities of infection (MOI) which also corresponds to 1x10⁵ to 100 or 50 x 10⁵ transducing units of the viral vector per 10⁵ cells. This, of course, includes amount of vector corresponding to 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 50 MOI.

Prior to, during, and/or following transduction, the cells may be cultured in media suitable for the maintenance, growth, or proliferation of the cells. The culture conditions of the population of cells will vary depending on different factors, notably, the starting cell population. Suitable culture media and conditions are well known in the art. The culture may be carried out in natural medium, a semi-synthetic medium or a synthetic medium in terms of composition, and may be a solid medium, a semisolid medium or a liquid

medium in terms of shape, and any nutrient medium used for cell culture, such as stem cell culture, which may be supplemented with one or more of growth factors. Such medium typically comprises sodium, potassium, calcium, magnesium, phosphorus, chlorine, amino acids, vitamins, cytokines, hormones, antibiotics, serum, fatty acids, saccharides or the like. In the culture, other chemical components or biological components may be incorporated singly or in combination, as the case requires. Such components to be incorporated in the medium may be fetal calf serum, human serum, horse serum, insulin, transferrin, lactoferrin, cholesterol, ethanolamine, sodium selenite, monothioglycerol, 2-mercaptoethanol, bovine serum albumin, sodium pyruvate, polyethylene glycol, various vitamins, various amino acids, agar, agarose, collagen, methylcellulose, various cytokines, various growth factors or the like. Examples of such basal medium appropriate for a method of expanding stem cells include, without limitation, StemSpan™ Serum-Free Expansion Medium (SFEM) (StemCell Technologies®, Vancouver, Canada), StemSpan™ H3000-Defined Medium (StemCell Technologies®, Vancouver, Canada), CellGro™, SCGM (CellGenix™, Freiburg Germany), StemPro™-34 SFM (Invitrogen®), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Ham's Nutrient Mixture H12 Mixture F12, McCoy's 5A medium, Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), MEM medium (alpha Modified Eagle's Minimum Essential Medium), RPMI 1640 medium, Isocove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), StemPro34™ (Invitrogen®), X-VIVO™ 10 (Cambrex®), X-VIVO™ 15 (Cambrex®) and Stemline™ II (Sigma-Aldrich®).

Following transduction, the transduced cells may be cultured under conditions suitable for their maintenance, growth and/or proliferation. In particular aspects, the transduced cells are cultured for about 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 or 14 days before transplantation.

Culture conditions for maintaining and/or expanding stem cells are well known in the art. Typically, the culturing conditions comprise the use of factors like cytokines and growth factors, generally known in the art for stem cell expansion. Such cytokines and growth factors can be biologics or small molecules and they include without limitation IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, GM-CSF, SCF, Flt3-L, thrombopoietin (TPO), erythropoietin, and analogs thereof. As used herein, "analogs" include any structural variants of the cytokines and growth factors having the biological activity as the naturally occurring forms, including without limitation, variants with enhanced or decreased biological activity when compared to the naturally occurring forms or cytokine receptor agonists such as an agonist antibody against the TPO receptor (for example, VB22B sc(Fv)₂ as detailed in patent publication WO 2007/145227, and the like). Cytokine and growth factor combinations are chosen to maintain/expand stem cells while limiting the production of terminally differentiated cells. In one specific embodiment, one or more cytokines and growth factors are selected from the group consisting of SCF, Flt3-L and TPO.

Human IL-6 or interleukin-6, also known as B-cell stimulatory factor 2 has been described by (Kishimoto, *Ann. review of Immunol.* **23**:1, 2005) and is commercially available. Human SCF or stem cell factor, also known as c-kit ligand, mast cell growth factor or Steel factor has been described (Smith, MA *et al.*, *ACTA Haematologica*, **105**(3): 143, 2001) and is commercially available. Flt3-L or FLT-3 Ligand, also referred as FL is a factor that binds to flt3-receptor. It has been described (Hannum C, *Nature* **368**(6472):

643-8) and is commercially available. TPO or thrombopoietin, also known as megakaryocyte growth factor (MGDF) or c-Mpl ligand has been described (Kaushansky K (2006). *N. Engl. J. Med.* **354** (19): 2034-45) and is commercially available.

The chemical components and biological components mentioned above may be used not only by adding them to the medium but also by immobilizing them onto the surface of the substrate or support used for the culture, specifically speaking, by dissolving a component to be used in an appropriate solvent, coating the substrate or support with the resulting solution and then washing away an excess of the component. Such a component to be used may be added to the substrate or support preliminarily coated with a substance which binds to the component.

Stem cells may be cultured in a culture vessel generally used for animal cell culture such as a Petri dish, a flask, a plastic bag, a Teflon™ bag, optionally after preliminary coating with an extracellular matrix or a cell adhesion molecule. The material for such a coating may be collagens I to XIX, fibronectin, vitronectin, laminins 1 to 12, nitrogen, tenascin, thrombospondin, von Willebrand factor, osteopontin, fibrinogen, various elastins, various proteoglycans, various cadherins, desmocollin, desmoglein, various integrins, E-selectin, P-selectin, L-selectin, immunoglobulin superfamily, Matrigel®, poly-D-lysine, poly-L-lysine, chitin, chitosan, Sepharose®, alginate acid gel, hydrogel or a fragment thereof. Such a coating material may be a recombinant material having an artificially modified amino acid sequence. The stem cells may be cultured by using a bioreactor which can mechanically control the medium composition, pH and the like and obtain high density culture (Schwartz R M, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88:6760, 1991 ; Koller M R, *Bone Marrow Transplant*, **21**: 653, 1998; Koller, M R, *Blood*, **82**: 378, 1993; Astori G, *Bone Marrow Transplant*, **35**(1) 101, 2005).

The cell population may then be washed to remove the compound or composition of invention and/or any other component of the cell culture and resuspended in an appropriate cell suspension medium for short term use or in a long-term storage medium, for example a medium suitable for cryopreservation, for example DMEM with 40% FCS and 10% DMSO. Other methods for preparing frozen stocks for cultured cells also are available to those skilled in the art.

Compositions

In another aspect, the present disclosure provides a composition comprising the synthetic expression cassette, vector or cell described herein. The composition may comprise one or more carrier or excipient, e.g. a buffer, a saline solution, a preservative, etc. In an embodiment, the composition is a pharmaceutical composition comprising at least one pharmaceutically acceptable carrier or excipient. An "excipient," as used herein, has its normal meaning in the art and is any ingredient that is not an active ingredient (drug) itself. Excipients include for example binders, lubricants, diluents, fillers, thickening agents, disintegrants, plasticizers, coatings, barrier layer formulations, lubricants, stabilizing agent, release-delaying agents and other components. "Pharmaceutically acceptable excipient" as used herein refers to any excipient that does not interfere with effectiveness of the biological activity of the active ingredients

and that is not toxic to the subject, *i.e.*, is a type of excipient and/or is for use in an amount which is not toxic to the subject. Excipients are well known in the art (see, *e.g.*, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, by Loyd V Allen, Jr, 2012, 22nd edition, Pharmaceutical Press; *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, by Rowe *et al.*, 2012, 7th edition, Pharmaceutical Press). Pharmaceutical compositions may be prepared using standard methods known in the art by mixing the active ingredient having the desired degree of purity with one or more optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients and/or stabilizers. The excipient may be selected for administration of the composition by any routes, for example, for intravenous, parenteral, subcutaneous, intramuscular, intracranial, intraorbital, ophthalmic, intraventricular, intracapsular, intraspinal, intrathecal, epidural, intracisternal, intraperitoneal, intranasal or pulmonary (*e.g.*, aerosol) administration. In an embodiment, the pharmaceutical composition is formulated for injection, *e.g.* as a solution, suspension, or emulsion, including localized injection, catheter administration, systemic injection, intravenous injection, intraperitoneal injection, subcutaneous injection or parenteral administration.

Pharmaceutical compositions in some embodiments are provided as sterile liquid preparations, *e.g.*, isotonic aqueous solutions, suspensions, emulsions, dispersions, or viscous compositions, which may in some aspects be buffered to a selected pH. Liquid preparations are normally easier to prepare than gels, other viscous compositions, and solid compositions. Additionally, liquid compositions are somewhat more convenient to administer, especially by injection. Viscous compositions, on the other hand, can be formulated within the appropriate viscosity range to provide longer contact periods with specific tissues. Liquid or viscous compositions can comprise carriers, which can be a solvent or dispersing medium comprising, for example, water, saline, phosphate buffered saline, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, liquid polyethylene glycol) and suitable mixtures thereof.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the cells in a solvent, such as in admixture with a suitable carrier, diluent, or excipient such as sterile water, physiological saline, glucose, dextrose, or the like. The compositions can also be lyophilized. The compositions can comprise auxiliary substances such as wetting, dispersing, or emulsifying agents (*e.g.*, methylcellulose), pH buffering agents, gelling or viscosity enhancing additives, preservatives, flavoring agents, colors, and the like, depending upon the route of administration and the preparation desired. Standard texts may in some aspects be consulted to prepare suitable preparations.

Various additives which enhance the stability and sterility of the compositions, including antimicrobial preservatives, antioxidants, chelating agents, and buffers, can be added. Prevention of the action of microorganisms can be ensured by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, and the like. Prolonged absorption of the injectable pharmaceutical form can be brought about by the use of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers comprising the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, *e.g.* films, or microcapsules.

5 The formulations to be used for *in vivo* administration are generally sterile. Sterility may be readily accomplished, *e.g.*, by filtration through sterile filtration membranes.

Methods/uses

10 The present disclosure also relates to a method for inducing the expression of a gene of interest by a cell, the method comprising introducing the synthetic expression cassette or vector described herein in the cell. The present disclosure also relates to a use of the synthetic expression cassette or vector described herein for inducing the expression of a gene of interest by a cell. In an embodiment, the cell is a primary cell, for example a brain/neuronal cell, a peripheral blood cell (*e.g.*, a B or T lymphocyte, a monocyte, a NK cell), a cord blood cell, a bone marrow cell, a cardiac cell, an endothelial cell, an epidermal cell, an epithelial cell, a fibroblast, hepatic cell or a lung/pulmonary cell. In an embodiment, the cell is a bone
15 marrow cell, peripheral blood cell or cord blood cell. In a further embodiment, the cell is an immune cell, such as a T cell (*e.g.*, a CD8⁺ T cell), a B cell or a NK cell.

In an embodiment, the gene of interest encodes a protein that is defective or absent in the cell. In an embodiment, the gene of interest encodes a recombinant receptor, such as a chimeric antigen receptor (CAR). In an embodiment, the gene of interest encodes a differentiation factor (for cell reprogramming).

20 The present disclosure also relates to a method for treating a disease, condition or disorder in a subject, the method comprising administering a cell comprising the synthetic expression cassette or vector described herein. The present disclosure also relates to the use of a cell comprising the synthetic expression cassette or vector described herein method for treating a disease, condition or disorder in a subject. The present disclosure also relates to the use of a cell comprising the synthetic expression cassette or vector
25 described herein method for the manufacture of a medicament for treating a disease, condition or disorder in a subject. In an embodiment, the disease, condition or disorder is associated with the absence of expression of a protein or the expression of a defective (*e.g.*, mutated) protein, and the synthetic expression cassette or vector comprises a nucleic acid encoding a functional (*e.g.*, native) protein (*e.g.*, gene therapy). Examples of diseases/disorders associated with the absence of expression of a protein, or the expression of
30 a defective (*e.g.*, mutated) protein (*e.g.*, genetic diseases/disorders), include certain hematologic and lysosomal storage diseases such as Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) (Aiuti *et al.*, *Science* **341** (6148)), metachromatic leukodystrophy (MLD) (Biffi *et al.*, *Science* **341** (6148)), Leukocyte adherence deficiency, X-linked CGD, Fanconi anemia, adrenoleukodystrophy, Mucopolysaccharidosis IIIA, as well as immunodeficiencies such as severe combined immunodeficiency (SCID) and adenosine deaminase (ADA)
35 deficiency.

The disease or condition that is treated can be any in which expression of an antigen is associated with and/or involved in the etiology of a disease condition or disorder, *e.g.* causes, exacerbates or otherwise

is involved in such disease, condition, or disorder. Exemplary diseases and conditions can include diseases or conditions associated with malignancy or transformation of cells (*e.g.*, cancer), autoimmune or inflammatory disease (*e.g.*, arthritis, rheumatoid arthritis (RA), Type I diabetes, systemic lupus erythematosus (SLE), inflammatory bowel disease, psoriasis, scleroderma, autoimmune thyroid disease, Grave's disease, Crohn's disease, multiple sclerosis, asthma, and/or a disease or condition associated with transplant), or an infectious disease, *e.g.* caused by a bacterial, viral or other pathogen. In particular embodiments, the recombinant receptor, *e.g.*, the CAR, specifically binds to the antigen associated with the disease or condition. In an embodiment, the disease, condition or disorder is cancer or an infectious disease, and the nucleic of interest present in the synthetic expression cassette or vector encodes a recombinant receptor, such as a chimeric antigen receptor (CAR), that recognizes an antigen expressed by the tumor cell or infected cell. The tumor may be a solid tumor or a hematologic (blood) tumor. In an embodiment, the cancer is a hematologic cancer, such as a lymphoma, a leukemias, and/or a myeloma (*e.g.*, B-cell, T-cell, and myeloid leukemias, lymphomas, and multiple myelomas). The infectious disease may be a disease caused by any pathogenic infection, such as a viral, bacterial, parasitic (*e.g.*, protozoal) or fungal infection, for example human immunodeficiency virus (HIV) or cytomegalovirus (CMV) infection.

The cells (engineered cells comprising the synthetic expression cassette or vector described herein) or compositions comprising same may administered to a subject or patient having the particular disease or condition to be treated, *e.g.*, via adoptive cell therapy such as adoptive T cell therapy, or stem cell therapy. Methods for administration of engineered cells for adoptive cell therapy are known and may be used in connection with the provided methods and compositions. For example, adoptive T cell therapy methods are described, *e.g.*, in U.S. Patent Application Publication No. 2003/0170238 to Gruenberg *et al.*; U.S. Patent No. 4,690,915 to Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* **8**(10):577-85). See, *e.g.*, Themeli *et al.* (2013) *Nat Biotechnol.* **31**(10): 928-933; Tsukahara *et al.* (2013) *Biochem Biophys Res Commun* **438**(1): 84-9; Davila *et al.* (2013) *PLoS ONE* **8**(4): e61338.

As used herein, "treatment" (and grammatical variations thereof such as "treat" or "treating") refers to complete or partial amelioration or reduction of a disease or condition or disorder, or a symptom, adverse effect or outcome, or phenotype associated therewith. Desirable effects of treatment include, but are not limited to, preventing occurrence or recurrence of disease, alleviation of symptoms, diminishment of any direct or indirect pathological consequences of the disease, preventing metastasis, decreasing the rate of disease progression, amelioration or palliation of the disease state, and remission or improved prognosis. The terms do not imply complete curing of a disease or complete elimination of any symptom or effect(s) on all symptoms or outcomes.

In some embodiments, the cell therapy, *e.g.*, adoptive T cell therapy or stem cell therapy, is carried out by autologous transfer, in which the cells are isolated and/or otherwise prepared from the subject who is to receive the cell therapy, or from a sample derived from such a subject. Thus, in some aspects, the cells are derived from a subject, *e.g.*, patient, in need of a treatment and the cells, following isolation and processing are administered to the same subject.

In some embodiments, the cell therapy, *e.g.*, adoptive T cell therapy or stem cell therapy, is carried out by allogeneic transfer, in which the cells are isolated and/or otherwise prepared from a subject other than a subject who is to receive or who ultimately receives the cell therapy, *e.g.*, a first subject. In such embodiments, the cells then are administered to a different subject, *e.g.*, a second subject, of the same species. In some embodiments, the first and second subjects are genetically identical. In some embodiments, the first and second subjects are genetically similar. In some embodiments, the second subject expresses the same HLA class or super type as the first subject. The cells can be administered by any suitable means. Dosing and administration may depend in part on whether the administration is brief or chronic. Various dosing schedules include but are not limited to single or multiple administrations over various time-points, bolus administration, and pulse infusion.

In certain embodiments, the cells, or individual populations of sub-types of cells, are administered to the subject at a range of about one million to about 100 billion cells and/or that amount of cells per kilogram of body weight, such as, *e.g.*, 1 million to about 50 billion cells (*e.g.*, about 5 million cells, about 25 million cells, about 500 million cells, about 1 billion cells, about 5 billion cells, about 20 billion cells, about 30 billion cells, about 40 billion cells, or a range defined by any two of the foregoing values), such as about 10 million to about 100 billion cells (*e.g.*, about 20 million cells, about 30 million cells, about 40 million cells, about 60 million cells, about 70 million cells, about 80 million cells, about 90 million cells, about 10 billion cells, about 25 billion cells, about 50 billion cells, about 75 billion cells, about 90 billion cells, or a range defined by any two of the foregoing values), and in some cases about 100 million cells to about 50 billion cells (*e.g.*, about 120 million cells, about 250 million cells, about 350 million cells, about 450 million cells, about 650 million cells, about 800 million cells, about 900 million cells, about 3 billion cells, about 30 billion cells, about 45 billion cells) or any value in between these ranges and/or per kilogram of body weight. Dosages may vary depending on attributes particular to the disease or disorder and/or patient and/or other treatments.

In some embodiments, for example, where the subject is a human, the dose of recombinant receptor (*e.g.*, CAR)-expressing cells, stem cells, T cells, or peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), is at least 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 or 1×10^5 cells, for example in the range of about 1×10^6 to 1×10^8 such cells, such as 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , or 1×10^8 or total such cells, or the range between any two of the foregoing values.

In some embodiments, the cells are administered as part of a combination treatment, such as simultaneously with or sequentially with, in any order, another therapeutic intervention, such as an antibody or engineered cell or receptor or agent, such as a cytotoxic or therapeutic agent. The cells in some embodiments are co-administered with one or more additional therapeutic agents or in connection with another therapeutic intervention, either simultaneously or sequentially in any order. In some contexts, the cells are co-administered with another therapy sufficiently close in time such that the cell populations enhance the effect of one or more additional therapeutic agents, or vice versa. In some embodiments, the cells are administered prior to the one or more additional therapeutic agents. In some embodiments, the

cells are administered after the one or more additional therapeutic agents. In some embodiments, the one or more additional agents include a cytokine, such as IL-2, for example, to enhance persistence. In some embodiments, the methods comprise administration of a chemotherapeutic agent.

The cells may be used in combination with other therapy such as other chemotherapy, immunotherapy, radiotherapy, or surgery, according to the disease to be treated.

In some embodiments, the synthetic expression cassette is used as a research tool, for example as reporter tool or in a commercial detection method (assay development). For example, the synthetic expression cassette may be operably linked to a nucleic acid encoding a reporter protein, which may be used for the detection of the expression of a gene of interest in a specific cell type, *e.g.*, to confirm that the gene of interest has been taken up by and is expressed by the cell. The term “reporter protein” refers to a protein that may be easily identified and measured such as fluorescent and luminescent proteins (*e.g.*, GFP, YFP), as well as enzymes that are able to generate a detectable product from a substrate (*e.g.*, luciferase). The synthetic expression cassette may also be used for the cell-specific expression of a gene of interest *in vitro*, *e.g.*, to assess the effect of the expression of the gene of interest in the targeted cells.

MODE(S) FOR CARRYING OUT THE INVENTION

The present invention is illustrated in further details by the following non-limiting examples.

Example 1: Material and methods

Experimental design. The experimental strategy to generate synthetic specific promoter (enhancer + minimal CMV promoter) was to first select specific enhancer sequences *in silico*, amplify the sequence(s) by PCR and then clone the endogenous enhancer sequences upstream of a minimal promoter, namely the CMV minimal promoter (minCMV)⁵. To validate the specificity of the synthetic promoter (enhancer + minCMV) through expression pattern assays, it was cloned upstream of a GFP reporter gene. As proof-of-concept of functional uses, it was cloned upstream of a chimeric antigen receptor (CAR).

Design of specific promoter sequences. Enhancer sequences that are specific for a particular cell type, and that are located upstream of a transcription start site, were selected *in silico*. To do so, the *in silico* method of selection was based on the “Functional Annotation Of The Mammalian genome” FANTOM5 database (generated by RIKEN)^{3,4}. The FANTOM5 database has systematically investigated exactly what are the sets of genes that are active in virtually all cell types across the human body, and the genomic regions, which determine where the genes are read from. Therefore, this database includes a large number of active enhancer sequences of different subtypes. In order to browse this data and to select enhancers, the PrESSTo (Promoter Enhancer Slider Selector Tool) for human enhancer was used (<http://enhancer.binf.ku.dk/enhancers.php>). PrESSTo allows for the selection of enhancers expressed in one of many cells or tissues based on sliders.

The first step to select specific enhancer sequences was based on the Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) score reported in FANTOM5 database. A percentage for the cell type of interest (T or

NK cell) was chosen, namely 60% for T cells 30% for NK cells. The percentage number for each cell type refers to the proportion of CAGE tag in the given cell population relatively to CAGE tag counts from all cells. The percentage number is a "lowest bound" value: only the enhancers that have higher or equal percentage of expression than the set value for the cell type were returned. The percentage was selected according to the number of hits in the results box. In average, the percentage was set to have less than 20 hits.

The enhancer sequence candidates identified were then selected based on the following criteria:

- a high score (over 0,15 tags per million) in samples representing the cellular population of interest (*e.g.*, T cells or NK cells);
- a low score for all other populations (less than 0,15 tags per million);
- significantly overrepresented only in the given population(s), as defined by PreSSTo.

The selected enhancer sequence candidates were then validated based on ChIP-Seq data, available through the UCSC genome browser tool (Kent WJ, *et al.* The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002 Jun;12(6):996-1006 - link available specifically for the selected sequence via the tab "View in UCSC" in the PreSSTo tool or at <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). The presence of transcription factor fixation sites that are related to the lineage of interest (*e.g.*, POU2F2 in hematopoietic lineage, GATA3 for T cells) or that are indicative of active regions (*ex.*: POLR2A) were analyzed. The presence of such sites in the vicinity (within 2000-3000 bp) of the selected enhancer was considered to be indicative of a transcriptionally active region⁷. Additional bioinformatic analysis was used to impose upon the remaining candidate regulatory regions more stringent selection criteria using publicly available cell-specific epigenetic characteristics (ENCODE database): (1) chromatin accessibility (*i.e.* DNase-seq, FAIRE-Seq) and (2) histone modifications differentiating active from inactive enhancer regions (ChIP-Seq for H3K27ac). For purposes of illustration, the following strategy was used for selecting the most promising B cell-specific regulatory regions. After using the PreSSTo tool to select B-cell-specific regulatory regions (*i.e.* specific CAGE signal in genomic regions of B cells and much less in others), the genomic coordinates of those candidate regulatory regions were submitted to the Galaxy bioinformatic web portal (<https://usegalaxy.org/>). The same procedure was followed in order to upload into the Galaxy portal the epigenomic data obtained from ENCODE for chromatin accessibility (FAIRE-Seq or/and DNase-Seq) and H3K27ac modifications (ChIP-Seq) for the human cell types of interest, that is B cells, T cells, CD4 cells, CD8 cells, NK cells, monocytes and/or neutrophils and/or CD34+ cells. The next step was to intersect the ensemble of B cell regulatory regions discovered by PreSSTo for presence of B cell-specific H3K27Ac enrichment peaks, which restricts the list to CAGE regions that show an active H3K27Ac signature. The latter regions were then queried for presence of an open chromatin (occurrence of DNA-seq peaks) in B cells, which restrict the CAGE B cell enhancers to those that show evidence of an open chromatin state in B cells along with accompanying H3K27Ac modification (epigenetic signature of transcriptional activity; strongly associated with active enhancers). Further purging of the latter list was performed to successively eliminate the regions that show evidence of chromatin opening and H3K27 acetylation in non-desired cell

types, such as T cells, NK cells, monocytes and CD34⁺ cells. The resulting final list was manually curated in the CAGE database for tag signal intensity and cell specificity, including further analysis of transcription factor binding, occurrence of over-represented DNA motifs (MEME tool) and proximity of known cell-specific genes.

- 5 *Enhancer amplification for cloning.* Once selected using the methodology described above, the enhancer sequence candidates were amplified by PCR from genomic DNA of cell lines (Jurkat T cell line or NK92 cells) and were then inserted in a cloning plasmid. To design PCR primers, a pair of primers of 18 to 22 nucleotides that have similar melting temperatures and that are spaced from the enhancer sequence of at least 10 nucleotides, in an effort to minimize the PCR amplicon size. PCR primers specificity was
10 verified using UCSC genome browser tool. The primers were designed to add a restriction enzyme site and 6bp randomly selected to allow an efficient cleavage (lowercase in **Table II**).

Table II lists all PCR primers (capital letters) designed to amplify the enhancer sequences from Jurkat T cell genomic DNA extracts, their apposed restriction site (in lowercase), and their PCR amplification conditions. The PCR was performed using the Q5 polymerase, according to the
15 manufacturer's instructions (New England Biolabs, MA). The amplification conditions were the following:

denaturation: 98°C for 30 sec;

amplification (35 cycles): 98°C for 10 sec/ T_m°C* for 30 sec /72°C for 30 sec; and

extension: 2 min at 72°C.

*appropriate T_m for each reaction are indicated in **Table I**.

20

Table II. PCR amplification of enhancers sequences selected *in silico*

Enhancer name	PCR Primer sequences	Restriction sites	PCR conditions (T _m)
Tenh (Chr16-445)	atcatcgccggccgcGGGTCTGACGTGCTCTGT (SEQ ID NO:1) tattcagcggccgcgaCCTGGGTCAGTGCGTCA (SEQ ID NO:56)	<i>NotI</i> <i>NotI</i>	72°C
NKspe-promoter (NK6)	attcggtaccGTGGGACACCAGTCATCTTA (SEQ ID NO:2) gtacgaattcGAGAGCACACACAGTCA (SEQ ID NO:57)	<i>KpnI</i> <i>EcoRI</i>	63°C
NKspe-candidate (NK20)	atatcgccggccgcGACCAGGTTTGGCCAATAGA (SEQ ID NO:3) gcgactagtTGCCAGCACCTGATTAAA (SEQ ID NO:58)	<i>NotI</i> <i>SpeI</i>	68°C

T-NK spe candidate (Chr14-591)	atcaggatccGACACTTGTTCTGGGACCTA (SEQ ID NO:4) cgcgcggaattcACCATACTGGTATATTCATTCTCTC (SEQ ID NO:59)	<i>Bam</i> HI <i>Eco</i> RI	63°C
NKspe-candidate (NK8)	cagggaattcGCTTACTTGTTAGCATCCCTCTCatacgc(SE Q ID NO:5) ggccgcTGA CTTAGTCCTAAAGCATATCTTGG (SEQ ID NO:60)	<i>Eco</i> RI <i>Not</i> I	66°C
B-cell specific candidate	acggcaatcttggtaccCTCCAGTGCCAGATTTTTTCAGGG (SEQ ID NO: 61) catgcgggtaccagtacgactagtGAACTGGCTGGGCTATTTT GTGC (SEQ ID NO: 62)	<i>Kpn</i> I <i>Spe</i> I	60°C

The PCR product length was verified on agarose gel and purified using the QIAquick™ PCR Purification Kit (Qiagen, Germany). The PCR product was then digested with the corresponding restriction enzymes (see Table I) for cloning.

5 *Cloning strategy to create a synthetic promoter from the in silico selected enhancer.* To generate a specific promoter from the selected and PCR-amplified enhancer, the endogenous enhancer sequences were cloned upstream of a minimal promoter, namely the CMV minimal promoter (minCMV: GTAGGCGTGTACGGTGGGAGG TCTATATAAGCAGAGC TCGTTTAGTGAACCGTCAGATC, SEQ ID NO:6)⁵. To validate the specificity of the synthetic promoter (enhancer + minCMV) through
10 expression pattern assays, it was cloned upstream of a GFP reporter gene. To perform these tests, the backbone of the pENTR1a vector (Addgene, #11813-011) digested with the appropriate restriction enzymes was used and treated with recombinant shrimp alkaline phosphatase (rSAP, New England Biolabs, MA) to prevent self-ligation of the pENTR1a vector. A ligation reaction using T3 Ligase enzyme (New England Biolabs, MA) was performed to create the final plasmids.

15 The detailed cloning strategy for the Tenh (Chr16-445) is illustrated in **FIGs 1A-B** (history is depicted from the bottom-up). Briefly, pENTR1a-IRES-GFP was obtained by inserting the IRES-GFP sequence from pIRES2-AcGFP (ClonTech/Takara) in the pENTR1a gateway plasmid (Addgene, #11813-011). The minCMV was also excised from (ClonTech/Takara) and inserted in using *Not*I and *Xho*I enzyme to obtain the pENTR1a-minCMV-IRES-GFP. The IRES sequence was then removed by a digestion *Xho*I-
20 *Nco*I, creating the pENTR1a-minCMV-GFP, in order to prevent this sequence to interfere with the synthetic promoter function and specificity. The SV40 poly(A) signal was inserted downstream of the GFP to stabilize the mRNA to create the pENTR1a-minCMV-GFP-SV40polyA. SV40 poly(A) sequence was amplified by PCR using the plasmid (Addgene #45461) as template. This pENTR1a-minCMV-GFP-SV40polyA plasmid was the plasmid used to clone all the enhancer sequences to perform the *in vitro*
25 expression pattern analysis experiments. As described above, the PCR amplicon of the selected enhancer

was digested using the appropriate restriction enzymes (listed in **Table II**) and inserted upstream of the minCMV sequence in pENTR1a-minCMV-GFP-SV40polyA. Plasmids were sequenced to ensure that the constructs correspond to the designed sequences.

Lentiviral particles were then produced in order to perform expression pattern tests *in vivo* and/or in NK cells. To produce the particles, a pHR-SIN vector backbone was first used. The cloning strategy is depicted in **FIG. 2**. Briefly, a pHR-SIN-Dest vector, that is devoid of the spleen focus-forming virus (SFFV)-GFP sequence originally comprised within the pHR-SIN-SFFV-GFP vector (kindly given by Els Veroheyen, France), was generated by introducing a LR cloning sites (attB1/attB2) amplified from the pLenti CMV/TO Puro DEST (Addgene, #17293) to replace the SFFV-GFP fragment. This plasmid was used to insert the “ENH-minCMV-GFP-SV40polyA” sequence from the pENTR1a (described above) using the Gateway LR clonase kit (Invitrogen, CA), using manufacturer’s instructions. To produce viral particles, this vector was co-transfected in HEK293T cells (ATCC, CRL-3216) along with 3 others, the p8.91 that provides packaging enzymes and 2 vectors, pH830 and pF824, coding for measles virus proteins that optimize CD34⁺ transduction^{8,9}. For NK cells transfection, lentiviral particles with a baboon retroviral envelope glycoprotein (pBaEV vector, kindly given by Els Veroheyen) were produced¹⁰.

In vitro Validation of Tenh (Chr16-445) and NKspe (NK6). To assess the specificity of the constructs, the vectors were transfected into human cell lines of various hematopoietic origin. First, for Tenh (Chr16-445), Jurkat T cells (T cell line, ATCC IB-152) and K-562 cells (erythroid myeloid cell line, CCL-243) were transfected. pENTR1a-Tenh-minCMV-GFP-SV40polyA was transfected using Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen, CA) according to manufacturer’s instructions. GFP signal was analyzed by flow cytometry (BD LSR II-Fortessa). It was observed that GFP was expressed only in Jurkat cells. These observations were then validated in primary human cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (obtained from healthy controls with written consent, (REB#3527)) were nucleofected by electroporation using human monocyte nucleofector kit from Lonza, and the subpopulation expressing GFP was identified by flow cytometry. An anti-CD19 antibody was used to identify B cells (anti-CD19 PE clone HIB19 Biolegend), an anti-CD3 antibody was used to identify T cells (anti-CD3 PE clone HIT3a BD Pharmingen) and an anti-CD14 antibody was used to identify monocytes (anti-CD14 APC-Cy7, clone HCD14 Biolegend).

To test the specificity of the NKspe enhancer (NK6), a similar strategy was used. The vectors were transfected into cell lines of different hematopoietic origin with the pENTR1a-NK6-minCMV-GFP-SV40polyA. For this experiment, NK-92 (NK cell line, ATCC, CRL-2407), Jurkat (T cell line, ATCC IB-152), 697 (B-cell line, DSMZ ACC42) and K-562 (myeloid cell line, CCL-243) cells were transfected.

The B-cell specific enhancer capacity to induce the expression of a protein in a B cell line was tested by transducing Nalm6 cell line (B cell line, ATCC, CRL-3273) with BaEV-lentivirus particles coding for Benh-minCMV-GFP-SV40polyA. The GFP expression pattern was analyzed by flow cytometry, using an anti-CD19 antibody co-staining B cells (anti-CD19 PE clone HIB19 Biolegend).

In vivo validation of the T cell-specific (T-specific/Chr16-445), NK cell-specific (NK8) and B cell-specific promoter constructs. To assess if the GFP expression pattern was similar *in vivo*, human HSC isolated from cord blood (CD34 MicroBead Kit UltraPure, Miltenyi Biotec, Germany) were transduced with measles or BaEV lentiviral particles coding either for the Tenh-minCMV-GFP-SV40polyA, Tenh-minCMV-CAR-CD22-SV40polyA, NK8-minCMV-GFP-SV40polyA or Benh-minCMV-GFP-SV40polyA. Cord bloods were obtained at the CHU Sainte-Justine Biobank of Cord Blood for research with the written consent of the mothers. Briefly, 200 μ L of concentrated measles lentiviral particles were coated in 12-well plates containing RetroNectin (Takara Bio USA) for 4 hours at 37°C. 250,000 purified CD34⁺ HSC in 150 μ L of StemSpan (StemCell, Canada) containing 5 nM Rapamycin and 3 μ M CIHR99021 were added to maintain stemness¹². The plate were then centrifuged for 1 hour at 1,000g; after which 700 μ L of StemSpan / Rapamycin / CIHR99021 media was added. Cells were cultured for 3 days and then injected in mice. NOD-scid IL2R γ ^{null} (NSG mice) were acquired from Jackson laboratory (#005557), bred and maintained under specific pathogen-free conditions. Mice were preconditioned using gamma radiation with 2 Gy. 10⁵ of CD34⁺ cells that were in contact with the lentiviral particles were injected intravenously (IV) into 7-11 weeks old NSG mice.

To study the activity of the T-cell specific promoter in a more physiological context where the maturation of engineered T-progeny is taking place in a human thymus, a group of mice was also engrafted with 3 pieces of pre-cultured human thymus in the quadricep muscle¹³. Thymus pieces were harvested from cardiac surgery procedures (where the thymus is removed for the sake of the surgery) following approval of a research protocol by Sainte-Justine Hospital institutional review board (and written informed consent from donors). Pieces of thymus (2-5 mm³) were cultured for 10 days on a GelFoam Sponge and an isopore membrane of 0.8- μ m^{13,14} in Ham's F-12 nutrient mix 1X medium (F12) supplemented with 0.025 M HEPES pH 7.5 and 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies).

Mice were bled regularly to monitor human cell reconstitution. Reconstitution and GFP expression were analyzed by flow cytometry using anti-mouse CD45-PerCP-Cy5.5 (clone 30F11), anti-human CD45-PE-Cy7 (clone HI31), anti-human CD19-PE (clone HIB19), anti-human CD14-APC-Cy7 (clone HCD14), and anti-human CD3-APC (clone HIT3a) (all from Biolegend). Mice were maintained either in the animal facility of CHU Sainte-Justine Research Center.

Functional Validation in vitro of the T-specific promoter construct (T-specific/Chr16-445). To assess the potential therapeutic use of the Tenh-promoter, the eGFP sequence was replaced by a sequence coding for a CAR-CD33 or a CAR-CD22. CAR-CD33 was generated by synthesizing the ScFv sequence of gemtuzumab ozogamicin monoclonal antibody¹⁵ (IDT Technologies) and cloning this sequence in a second-generation CAR construct (CD28-CD3 ζ). The CAR-CD22 construct was based on the m971 ScFv sequence fused to 28z and BBz (Hasegawa *et al. Blood*. 2013;121(7):1165-1174). The CAR-GD2 construct was based on the 14g2a ScFv sequence (Louis CU *et al., Blood*. 2011; **118**:6050-6) cloned in a second-generation CAR construct (CD28-CD3 ζ). To produce VSVg lentiviral particles, the construct was cloned in a pHR SIN vector and particles were produced in HEK293 as described above.

Primary T cells were isolated from a 10-ml blood sample of a healthy donor. PBMCs were isolated by Ficoll™ and T cells were purified using the T cell enrichment kit (#19051, StemCell Technologies, Canada). Five hundred thousand (500,000) T cells were then put in culture in 900 µL of RPMI/10%FBS supplemented with 30 U/mL of human recombinant IL-2 and with Dynabeads in a 1:1 ratio (12.5 µL/well; Life Technologies). On the second day, 100 µL of concentrated lentiviral particles were added along with 8 µg/mL of protamin sulfate and culture for the next 6 following days. Recombinant human IL-2 (30 U/mL) was added every odder day. Expression of the CAR-CD33 on the surface of T cells was validated using a soluble CD33-Fc chimera protein (Siglec3/CD33 Fc R&D Systems, MI) and detected by a secondary staining using polyclonal anti-IgG PE (Jackson ImmunoResearch) by flow cytometry. Similarly, the detection of CAR-CD22 expression was performed by incubating cells with 2 µl Siglec2(CD22)-Fc chimera (50 mg/ml, R&D) for 30 minutes at 4°C, washed and stained with anti-Fc-PE (Jackson Immune), anti-CD56-APC and anti-CD3-FITC (Biolegend). The detection of the CAR-GD2 was performed using anti-mouse Fab (Jackson Immune 115-065-006) for 30 minutes at 4°C, washed and then stained with a streptavidin-PE (Biolegend).

Functionality of CAR-CD33-transduced T cells was then evaluated in a cytotoxic assay against native CD33⁺ (ATCC # CCL-240) or CD33⁻ HL-60 cell line (generated using CRISP technology). Similarly, functionality of CAR-CD22-transduced T cells was tested in cytotoxic assay against RS4;11 (B-ALL cell line expressing CD22, ATCC # CRL-1873), and functionality of CAR-GD2-transduced T cells was assessed against the GD2-expressing SK-N-DZ neuroblastoma cell line (ATCC, CRL-2149). Briefly, HL-60 (for CAR-CD33), RS4;11 (for CAR-CD22) or SK-N-DZ (for CAR-GD2) target cells were stained with PKH26, a membrane labeling dye with long aliphatic tails which stably stains cell membrane. Following coincubation with effector T cells, the absolute count of living targets was calculated using CountBright™ Absolute Counting Beads (ThermoFisher) as well as the use of a viability dye (7-AAD). Briefly, 2 x 10⁶ target cells were washed twice in RPMI 1640 or D-PBS and resuspended in 100 µL of diluent C, then 100 µL of PKH26 (8 µM in diluent C) was added and cells were incubated 5 min at room temperature. The staining was stopped by adding FBS. Cells were then plated in different effector:target ratios (1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1) and incubated for 24 hrs. After 24 hours, cells were harvested, stained with 7-AAD (BD Biosciences) and analyzed by flow cytometry. Cytotoxicity was calculated as follow: % Specific lysis = 100-[(absolute count of PKH26⁺ 7-AAD⁻ targets after incubation with effector cells) / (absolute count of PKH26⁺ 7-AAD⁻ targets after incubation alone) X 100].

Kinetic of expression, during in vitro T-cell differentiation, of a CAR under the T-specific promoter construct (T-specific/Chr16-445). First, human HSC isolated from cord blood (CD34 MicroBead Kit UltraPure™, MiltenyI Biotec, Germany) were transduced with BaEV lentiviral particles coding for the Tenh-minCMV-CAR-CD22-SV40polyA as described above. To test the expression of CAR by CD34⁺ cells progeny, engineered-CD34⁺ cells have been co-cultured with OP9-DL4 cells or OP9 (without DL4) to induce the differentiation of CD34⁺ into T and B cells, respectively (La Motte-Mohs RN *et al.*, *Blood*. 2005;105(4):1431-9. Epub 2004 Oct 19). Cells were co-cultured in a medium containing: alpha MEM

(Gibco), 20% HyClone™ Characterized FBS GE Healthcare), GlutaMAX-ITM, PenStrep, 5 ng/mL IL-7 (Peprotech), 5 ng/mL FLT-3L (Peprotech) and 800uM L-Ascorbic acid 2-phosphate (Sigma). Cells were co-cultured for 2 weeks and medium was changed twice a week, and feeder cells (OP9 or OP9-DL4) were change each week. CAR expression on different sub-population was evaluated by flow cytometry using two antibody panels: 1) anti-CD1a-BV421 (clone HI49, Biolegend), anti-CD7-FITC (clone M-T701, BD Biosciences), anti-CD45-PeCy7 (clone HI30, Biolegend), anti-CD34-APC (clone 581, Biolegend), anti-CD19-APC-Cy7 (clone HIB19, Biolegend); and 2) anti-CD4-APC-Cy7 (clone RPA-T4, Biolegend), anti-CD8-APC (RPA-T8, BD Biosciences), anti-CD3-FITC (clone UCHT1, Biolegend), anti-CD45-PeCy7 (clone HI30, Biolegend). In both panels, the detection of CAR-CD22 expression was performed by incubating cells with 2 µl Siglec2(CD22)-Fc chimera (50 mg/ml, R&D) for 30 minutes at 4°C, washed and stained with anti-Fc-PE (Jackson Immune), and DAPI was used as a viability staining.

The specificity of the NK8 promoter was also assessed in the OP9 co-culture system, in conditions favoring NK cell differentiation (Beck RC *et al.*, *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009, **15**(9):1026-37). Human HSC isolated from cord blood (CD34 MicroBead Kit UltraPure™, MiltenyI Biotec, Germany) were transduced with BaEV lentiviral particles coding for the NK8-minCMV-GFP-SV40polyA as described above. Transduced cells were co-cultured with OP9 cells was performed as described above with the addition of IL-15 (10ng/mL) for the differentiation of NK cells. GFP expression was evaluated by flow cytometry. Co-staining of anti-CD56, anti-CD45, anti-CD4 and anti-CD8 (Biolegend) was performed to identify cell subpopulations.

Example 2: Promoter sequences tested and validated

The first step was to identify a specific enhancer to create a synthetic promoter for T cells. 5 enhancers sequence candidates that fulfilled the above-described criteria were identified (Chr16-445 (SEQ ID NO:7); Chr 14-591 (SEQ ID NO:13); Chr 8-438 (SEQ ID NO:8); Chr 8-230 (SEQ ID NO :9); Chr 12-199 (SEQ ID NO:10). Of those, the Chr16-445 sequence was thoroughly studied as each validation step was conclusive. This sequence, detailed in **Table III**, contains highly-repeated motifs, and is only significantly overexpressed in T cells (with a tags/million score of 0.511 in T cells). It is located in Chromosome 16 (position 88536883-88537327) and is 445-nucleotide long. Within 2.5 kb up-stream of the enhancer sequence, 23 putative binding sites for transcription factors such as Gata1, POLR2A, POU2F2 and MYC were identified, providing compelling evidence that it is located in a transcriptionally active region.

Similarly, 2 potentially NK-specific enhancer sequences were selected (NK6 and NK20 – see **Table IIIa**), of which one (NK6) has resulted in a coherent pattern of expression in preliminary data. This sequence is located in Chromosome 6, is 379-nucleotide long and also contains highly repeated motifs. It was only significantly over-expressed in NK cells (tag score of 0.719 in NK cells). This sequence has 19 transcription factor binding site within less than 2 kb of the sequence. A second NK-specific candidate (NK20) located on Chromosome 20 has a tag score of 1.823 in NK cells.

An enhancer sequence that would induce the expression of a transgene in both T and NK cells could be interesting in the context of gene therapy of cytotoxic cells. A putative T and NK cell-specific promoter sequence was identified on Chromosome 14, position 61804524 to 61805115 (591 nucleotides). Its tags/million score is high in T cells (6.629) and in NK cells (3.327), with a significant expression only in these 2 cell subtypes. Four transcription binding sites - RUNX3, GATA2, FOS and JUN - are located within the enhancer sequence itself.

Also, 4 putative specific enhancers for B cells located on chromosomes 1, 3, 10 and 13 that matched the selection criteria were identified (B-spe candidates #1, 2, 3 and 4 - see **Table IIIa**).

Finally, several other candidate enhancers for different cell type(s) were also identified (**Table IIIb**).

Table IIIa: Characteristics of candidate enhancer sequences for T cells, NK cells, T/NK cells and B cells identified herein

Name	Position (hg38)	Sequence	Validation/ Characteristics
T enh (T-spe promoter/ Chr16-445)	chr16:88536883-88537327	CTGGTGGTGTGGAGGGCCGGGTGGTGAC ACTCAGTGACAGGTGAGGATGTGGCACG GTGTGGAGGGCCGGGTGGTGACGCTGAG TGACAGGTGAGGATGTGGCACGGTGTGG AGGGCCGGGTGGTGACGCTGAGTGACAG GTGAGGATGTGGCACGGTGTGGAGGGCC GGGTGGTGACGCTGAGTGACAGGTGAGG ATGTGGCACGGTGTGGAGGGCCGGGTGG TGACGCTGAGTGACAGGTGAGGATGTGG CACGGTGTGGAGGGCCGGGTGGTGACGC TGAGTGACACGTGAGGATGTGGCACGGT GTGGAGGGCCGGGTGGTGACGCTGAGTG ACAGGTGAGGATGTGGCACGGTGTGGAG GGCCGGGTGGTGACGCTGAGTGACAGGT GAGGATGTGGCATAGGGAAACACATCCT CGCCGAGCGCACAGTGGGAGCTCCG (SEQ ID NO:7)	<ul style="list-style-type: none"> • T-specificity confirmed <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> • Highly repeated motifs • Tags/million= 0.511 in T cells • Only significantly overexpressed in T cells
T-NK spe candidate (Chr 8-438)	chr8:101819182-101819619	CTGAGGACTTCTAGCTCTTCCTGGATCCTT ATATGCCCATTTGCTATTGTAAATAGCTA TATGACGTTGTGATACTATTCCAAACCCT AGTCATAGCAACCACATACCTAATAGCCA AGGGATAACCATACTATCTTCCCTTTCTG AAGAACCTTTCAGCAAAAGATTTTCAGGG AATTTTACCAAGAAAACCATCCCATCCCC	<ul style="list-style-type: none"> • Significantly over-expressed only in T and NK cells • Tags/million= 3.082 in T cells • Tags/million= 2.195 in NK cells

		TCCTCCTTCCATTTGACAGGTGGAGAAGT GAGGCACAGTGAAGCCAGAGGAGCCTGG TCAGACGGTGAGTCAGAAGTAGAGCAGG GCTGCACCTGGTGACACCTATTTCTCTCCC TTGTGGTTTGGCCCTGCCTCATAGGCTTC CTGGAAAGGTGTAGCTTCTTCATGGCTTA CTTGTTGAGTAAACACTGCTATGAGCTTT CAAATATTTCCCTAGGTTGCAGGAGGTTG TGTC (SEQ ID NO:8)	
T-spe candidate (Chr 8-230)	chr8:215311 2-2153543	CTAAAAACAAACAAAGCCAAAAAACCAT AGCACTTTATTTTAAGGATATTTCTACTTT AATCCATAAATGGTTTCTAGTTCTTGTATT AATGGCGACATCATGTTCCATGTTTTCAT GAACTGTGATTTATCAGAGAAGCCCTTGC AACGGTGATCTAGGTTGTGTCATCGCTTC TGCGTAACAGCAAGGCAAAGCTGCGGAT TTATCGCCGTTCTACCCAGGTTTCCTGTTG ATTACGGCAGGGTTTGAGGTGCGGTCCCT GGTGTTTCATCATGACAAGTGAGGTTTG CAGGAGAACTTCATAACCATCTGCAGAA AAGGTGAAGTCACATCTTGAGACCAGCTC TAGATATGTTACCGATGGGCTAATGGTTT TGATGTAAAATAAGTAAAAACATTAAAG GGCTAGAAGAAGCCAGAGGAAAAGTCA (SEQ ID NO:9)	<ul style="list-style-type: none"> Significantly over-expressed only in T cells Tags/million= 1.348 in T cells
T-NK spe candidate (Chr 12-199)	chr12:91067 62-9106960	GTGAAATAAGACACACACAGAAAGAAAA ATATGATATGATATCGGTTGTATGTGGAG TCTTGAAAAAATCACCATAGAAACAGT GTAGGAAGATGGTTACCAGGGGCGGGGT AGGGGAAATGGGAAGATGTAGGTCAAAA GGTACGAAGTTGCGGTTAGATTCTAATGT TCTAGTGTGTAACATAAGGACTATAGTTA (SEQ ID NO:10)	<ul style="list-style-type: none"> Significantly over-expressed only in T and NK cells Tags/million= 1.294 in T cells Tags/million= 1.551 in NK cells
NKspe-promoter (NK6)	chr6: 168682215- 168682594	GCACATTCATCTCTCTGAGAAACACCTCC CTATGCTGGGAAATGTGAAAGCAGGTGG GACACCAGTCATCTTAGTACATCACATTG TCACTGCCGCGAATGTGTGGGACACCCAT CATCTTACCACATCACATCGTCACTGCCG CGAACGTGTGGGACACCCATCATCTTACC ACATCACATCGTCACTGCCACGAACGTGT	<ul style="list-style-type: none"> Evidences of NK specificity <i>in vitro</i> Highly repeated motifs Tags/million: 0.719 in NK cells

		GGGACACCCATCATCTTACCACATCACAT CGTCACTGCCGCGAACGTGTGGGACACCC ATCATCTTACCACATCACATCGTCACTGC CGCGAACGTGTGGGACACCCATCATCTTA CCACATCACATCGTCACTGCCGCGAACGT GTGGGACACCCATCATCTTACCACATCAC ATCGTCACTGCGTGAATGTTTTCTGAAT ACATCACACATTTGGCTCCATAAAATCTG TTTTCTAATCTACTTTTTAACTTAGTATGT TGGCCTCAACTTTGCACTTTATTTTTCTTC GTGACTGTGTGGTGCTCTCCTCTCTGGAG GTGCCTTCACTGAGGCTGCATTGAAGGGC TGTGTGGGCCAGCGAGTGCTGTGGTCGG (SEQ ID NO:11)	<ul style="list-style-type: none"> Significantly over-expressed only in NK cells
NKspe-candidate (NK20)	chr20:24013 863- 24014201	CTCTTCATTGACCCTGAGTTTGACCAGGT TTGGCCAATAGAAGTCAGAGGAAGTGAC AGGTGCCAGTTACAAGAAGTTCCACAACC CCTTTTAGAAATCAACTAAACCACTGTGT GAATAAAGCCAGGTTAGCCTGCTGGAGA ATGAGGCCCAATTGCTCCCATCATCTCAC ATGACAGCCAACCAACCACCAGTCATGTG ACTGAGGTCATCTTGGACCAGCCAAATTC CAACCAACCTTTTCAGTAGACCTCAGACA CATGAACAAACCCAACTAAGATCAACCA ACCCTAGACAGTTCTGCAGAGTTGCCAG TAACACACAGAATCATGACCAATAATAA ATGTGTACTGTTTGAAGTTGCCACATTGT TAAGTGGTTTGTTATGCCACAAAACTAA CTGACACATCAACTCTGAAACCTCCTTGG TTTAATCAGGGTGCTGGCAGGTACGGAGC AACTGTGCCCAGGGTAACATTACTTAGTC TCAGAATCATAATTAATTAAATTGCAAGT GACAGAAATATAATAAAATCT (SEQ ID NO:12)	<ul style="list-style-type: none"> Tags/million: 1.823 in NK cells Significantly over-expressed only in NK cells
T-NK spe candidate (Chr14-591)	chr14:61804 524- 61805115	TGATTTTAAGTGAAAGGTTTCTGAACTGT ATATATACAATATTTTCAAGACAGTAATTT CCTTTGCTTCATAGTACGGCACAACAGTG TTTGCACTTGATGTTTAGCGTAGCCTTGGT TTTGTTGTTTCAAGAGCCTTTGTTAGCTCT TTGGTTGTGCCAAGAATATATTGTTTTTG	<ul style="list-style-type: none"> Tags/millions: 6.629 in Tcells ; 3.327 in NK cells Significantly over-expressed only in T and NK cells

		AGTCTCCTTGCCGGGCCTCCTCGCCTTCTT GTCATGCACATCCTGTACCTGGGTTGTGG TTGTATTGATTTGCTGGGGCGCTGCTGTT GCAAATGTCTGGAGTGAATGAGAATGTGT TTGTGGGTGTCTGCCCTCACCTTGGCCAC TGATCTGCTTTCAGCCCTGAAGTACTGCC ATCTGCATGAACATTAGGGACCCCCAGCC TCCCCACCACTTAGTAAAGTACCCTGCA CATGTTTGGGATTCAGGAAATGTTTGTAG AAAGGAAAAATTCCTTATCATTCTTACC ATTCTCTGTCTTGAGTCTGAGTCATGATTC AAACACTTTTGCTAAAAGGTTTTCGCTTG AAAAATTCATATTCAGGTACAGATTTACT TTTTTTGGTGTGTGTGAGTTTAAGAGCTG CCTCAG (SEQ ID NO:13)	
NKspe-candidate (NK8)	chr8:103109 879- 103110286	ATCAGAAGTTGCGTGGGTCATGAAGCCC AAGGCCAGCAGTTCTGGATGCCTCCATG AAGCTGGATATTGCTTACTTGTTAGCATC CCTCTCTGGCAATCATCAATAACCTCTTT TCAAAAGTACCTCCTTATACAAGACTCT TATCAACTGATTTTCATCATTTTTAGCACT GAAACCTTGGTCTTCCTGCTCTCTGCTCT GACAGCATCTCTCTGATAACCTGAGAAA TCAGAGTTTCACCCCTGAAACTAAACAG GCCATTATTTCTTAATTTTAAATGATGAC ATGACAAGCCTTCACCCTATCTGTTTCTT ATTTCTTGAAGTCTCCACCCCTCACCAG CAGCCAACACAAATCACAACGCAATGCA AAGGCCAGGCCACAGAACACGCTGTGA ATCGACAGTTTCAGAAGACGTCATTCAC ACAAATGTGCAAGGCACTTCCTGCACAGC CATCTCTGTGCCCTGCAAAGGGCATGT GGCATGAGGCAGTAAAATAAGTATAGTC TGTGTTTGGGTATGAAAGGTGGTGGGTG GGGCGTGAATACATCCAAGATATGCTTT AGGACTAAGTCAAAAGAGAACTGAGAG TGAGAAAGAAGATTG (SEQ ID NO:14)	<ul style="list-style-type: none"> Tags/million: 31.336 in NK cells ; 2.013 in basophil; 1.503 in T cells; 0.835 in monocytes Significantly over-expressed in NK, basophils, T cells and monocytes
B-spe candidate #1 (B1)	chr1:220219 915- 220220218	CTGACAAGATGCAAGCTCATCATTTTGT TTTGTGTCATAAGGGCATTTCCTACTAA TTAGCGTTTTGGAAAACCTCCCCAATAA	<ul style="list-style-type: none"> RAB3GAP2 Tags/million: 5.001 in B cells

		TGGGGCCACAGTCTCTAACACTGCCCC TTTGAAGCTAGTGATCCAAAAATAATAT CATTTGACAAGGTAATTTCCCAAGCCAC GCCTGAAATGTAAAACAAAAAAGCAC CTCACTGCTTAAAGGTGCTCCACCAGGG ACCTTGGGTTTTCCACCAAACTTGCCTC CCCCACCCTGTTACTAAAGTTGACACTG AATTTGCCTGCAGTCTCCCCCA (SEQ ID NO: 23)	<ul style="list-style-type: none"> Negligible tags in other primary blood cell types
B-spe candidate #2 (B3)	chr3:112216852-112217043	TGGGCATGGTGGCTCATACCTGTAATCC TAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCAGGTGG ATCACTTGAGGTCAGGAGCTCCAGACCA GCCTGCCCCAACATGCATTGCATCCATAG CTTGGCTGACTTTCTTAAAAAACAGGTT GATGGCAAGAAAAGAGAACTGAGTAGA TGTTATAAATAGTTAAGTACAAATCTAT CACTACTTCTTGCGAAAATGCTCAGGCT GCCACACTGATGATGAATAGATAGCTCG TTCTTCCCAAAGTGAAGTGCAGTAGAGTG TTGCAGTGCTCAGTTGGGTAGGACAGAT GTTGGATAATTGGGGTTATCCAACATCT CTACTAAAAATACAAAAATTAGCTGTGC GTGGTGGAAGGTGCCTGTAATCCCAGCT A (SEQ ID NO:15)	<ul style="list-style-type: none"> Tags/million: 2.541 in B cells Significantly overrepresented in B cells
B-spe candidate #3 (B10)	chr10:49879351-49879455	AAGGAGGAATTGCTGTCTGAGAGGGTAT TTTGTTCCCCAGTGACTGAGGGCAGGGC AGGGGCAGGGAAGGCTTCCCCTCTCTTC TGGCCCTAGAGGCCCTGTAAATGCACTG TGCAGTCACTGACGTGCCCTCAGGCAGG GCCCTGGCGGGAAGGGGGCTGTTCCAGG TCTACCAGCTTCACACCCTTATTCTATTG AATTCTCATGAAAACAAAATCTGTGAAA CAGCTGTGATCTTCATTTTCTGATGAGGG AACAGAGCCTCCGTGCCCCCGAGATCAC TGGTATGACTCCAAAGATTTTCC (SEQ ID NO:16)	<ul style="list-style-type: none"> Tags/million: 1.993 in B cells Significantly overrepresented in B cells
B-spe candidate #4 (B13)	chr14:74868763-74868996	GACTCACACCTTTGGCCACTGACCCCTG CCCCACCTTCTGAGTGGGGTTCAGGGAC TGTGCTGAGTCTGTCTCTGGGAAGCAGC AGGGTGCAGGGGCACACTGATGAGTGGT	<ul style="list-style-type: none"> Tags/million: 2.534 in B cells

		GCATGTGCCCAGGGGCAACATCAGAGCC GTTTAGCCACCAGGGCAGTCAGGCATGG ACAGACGCATTTGGGAGGGGGCGGGGC CCTGTGTCAGCTGTTAACACTTCAGTTCC TGAAGCAGAGAAGTCTGGAGTTCTGGGG AGGGGCCAGGGAGGCAGGAGAGGGAAA CACTGGGAGGGTTTAGGGCTTGGCCTGT TTATCAACTACTGTGGAAGTATTTTCACT GTTCTGACAATCCCTGCAACTATGTCCAT GGACCTGCTGTCTATCCGCCCTGTTTCATC GGGAGGAAGAGATGGAGAAGGCTGCCG GGGTTCTGGGAGT (SEQ ID NO:17)	<ul style="list-style-type: none"> Significantly overrepresented in B cells
--	--	--	--

Table IIIb: Characteristics of candidate enhancer sequences for various cell types identified herein

Cell Specificity	Coordinates (hg38)	Sequence	Genome Location
T/NK	chr1:167489187-167489883	CCAACCCCCCTCCCCACCCCAAACCTCTGCTTATAG GTTCTTATATGATAATTTAAACTATATATGATATTA AATTAGCACTCCAATAGCAAAAATAAAGTGTTCCC ACATCACCTTCTTTGAAAATATTTATTTAAATAGGA TGAAATGTTATTGAGGGCTTTTGTGTCTAGAAACAG GGTTAATTAAAGATTTCTGCCTGCTTTGTGGGTAG GTGACACTCTCATTGAGATAGCAGCAATGCCCTATT TAGTGGTCTCTCAGCTTTCTTTCTATTCATCTGGTTT GGTAGTGGAATTCCATGGGAAGTTTGACCCTATTC AGTGATGAGAGAAGCAAAATACTGTTGTTCACCTA GAGGCTGTTTGCTCAGAAAAACAGGGTGTCAGAGA CATGGGACGCAAACCCAGAGTGACATAGCGCAGG GACTTGGCTCACTTTTCTGAGATCTGTAAAATGTGA TGTGACTGGCTCTCAGAAAGGAGGCTGAAGGGTTC CTGCCCCGATTGGTTTTCAAAGGGCAAGAGCCCCGC TGCTGAGGAGCTGCGGCTTTGTTAGACAAAAGCCC AGGGCAGCCCCCTCCTGGGCTCAGCGTTTTCCCCAC CTCCCCCTTTCTCACAGGCGGTTTCCCTGAAATGAA AGAACTGTGATGCATTTGCGCCTTCAAAGCAGTTT TTAAAATGCATTAAACCCA (SEQ ID NO: 18)	CD247
T/NK	chr1:167492555-167492938	TAGCAGGGAGGGGAATTTTCCTTTCTGGTCACGTA GGCTGCTGTCTTCGGCTTCGATTCGTAAGCCACCTC CCAAGCCCCCATTAGCCCCAGGTAGGGGACATCCC ATCCCCCTAAACCTCCTTCTTGAAGTACAGTTCAC	CD247

		CCCTAGAAGGAGGTGGGAAACCACTCAGATCCATC TCAAAGGGATGCCTACCAGGGTAGGTGTGTGGGAG GAAGGCTGAGCCCATGCTGTGTTCAGGGGCCCCC CAGAAGGTGTCAGCCTGGAGGAACATGCCCCACAG TTATAAAAGGCATCATTCCAGGAGCTATCATGGCG TCTGCTAGGGGCAGAGAGGAAGGGGAGGCAGGAA AGGGGCTGAGTATTTTGGGGCTGTATGCTTAT (SEQ ID NO: 19)	
T/NK	chr1:167516527- 167516891	GGCCTTTCCTCCGGGGAGACTGTGGAGGTGTCCCCT CAGGCAGCAAAAGCACCATCGCAGCCCTCGGTGTC AAGGCCTCTCTGAGTCGCGCTTTGCCTTACCGTACC TCGTTTCTGGGCTAGGATATTTTGAAACACTTTTGT CTATTAGCTTTATCTAAAATAGCTAAAATATCAGTC TCCATAGAGGCAAAGTAAGTGGCACTGAGAAGCAA AAAATCCAGCCAATGTGCAGTTTTCTCCTCCTGCCC CCTATTTGTGGAAATGAGGCACGGCCCCCATCTTGT CTGCTGGGTGGGGTTCTGTTTACCACGCTTGGCAGC CACCGCCACCCAACAATCTTTCATTTTCTTTCTAA CTTCAC (SEQ ID NO: 20)	CD247
T/NK	chr1:167516973- 167517468	GAGCTCCCTGGTGTGGTGTCTCAAGCCTGAAGCTC AGAGGCTGGAGCTATTGCCCCCTGGCTGTCTCCCCTG AAGTCACTAAATTCCAGCGTTCTGGGTCCCCTTGTC CCCAGCACACAAGGATGGGCTGCTCTGAGCAAGCT CAGGCACCCTCACTCTGCCACACTGTGTGTGTGACT TAGACCCCAACAAGGCTTTTCTGAGAAAACAGCTGT GACCTGACAGAAACCCCTGCAGCTGCACGGGCCCTC AGAATCCCCCGAGGCGCTGGCCCGGGCTGTGCCTG GCTCCCTGGTGGGAGCAGAAGTGCCCATGGCCTCT CCTGCCCTCCCAACAGGGCCCCCTAAACAAATTCCC ACACCCAGGTGAGTTACCAGGAGCGATCAGGTGGG CCGAGGACATTTGCTTGCTTCACCTTCCCTGTTTCTT TAGATTGAAATTCAGCCTGCCCCACTTCTCAGGAA GATGCCACGAGGCTGATCCCCCTGAGCAGTTTGTC (SEQ ID NO: 21)	CD247
CD4/NK	chr1:193458645- 193459063	TGGCTGGCAATCCTTTTTAGCCATCATATATAATAG CTATCTAACTCTTGATTTTTGTGTAACATAAAGCGG TGTTTCATAATGAATCATTTTGTCTGTTTCGTGTTCA AGTGCCCTATCTATTCTATCATTTGAAAAGCTAGTT ATGATAGTATGGTTTCAATTGTCAGACATTCTCTTT ATTCTAAAAAATAGGTTGACCCACATTTAGATGTT	intergenic

		TTCCTACTCAAAGGACTTTGAAAGAACTTTTTATGT AACACTTAGTCATTGCCCTTTTCACAGTCCCTCTTC CGCTGCTTCTAATTAGGCTCTTTGGTAGCTGGAATC GTCATTTCCCTGGCATGAAGGCACATGGTACCAAC TTGTTGGTTGCTTGATTTGGAGGGTCAAATATGGAC TTGCTTCTTTTGGTCTACCTTGC (SEQ ID NO: 22)	
B-cell	chr1:220219915- 220220218	CTGACAAGATGCAAGCTCATCATTTTGTGTTTGTGTC ATAAGGGCATTTCCTACTAATTAGCGTTTTGGAAA ACTTCCCCAATAATGGGGCCACAGTCTCTAACACT GCCCCTTTGAAGCTAGTGATCCAAAAATAATATCA TTTGACAAGGTAATTTCCCAAGCCACGCCTGAAAT GTAAAACAAAAAAGCACCTCACTGCTTAAAGGTG CTCCACCAGGGACCTTGGGTTTTCCACCAAAACTTG CCTCCCCCACCCTGTTACTAAAGTTGACACTGAATT TGCCTGCAGTCTCCCCCA (SEQ ID NO: 23)	RAB3GAP2
T/NK	chr10:6530291- 6530474	TGAGCTGTGCGCCCTTGGGTACACCAGTAGCAAAAA CACTCCTGTCTCCTATGCTGCTGTGACACCACACC CCACTTCCTCCCGCGGGCGTGTGACACTTTTCAAAG AAAATACAGTATTTGGTAGTATCAATACAGCAAGC GGAAGCAGCAGTGCTCAGTCCGCAGTGAGCTAACA GTTTTA (SEQ ID NO: 24)	PRKCQ
T/NK	chr10:6558358- 6558616	CAGACATACAGTACTATTTTGTGTTTTTTTAAAAAAG GCTTAGTAACACAAAGAGGAGTTACATACTGAAA CCCACAGCTGATTTAATTTGCAAAACCACAGCGTT AGCTTGACTAAAGTAAAGATGACACAGATAAAATG CAACCAGAAAAGTGAAGATAAAGATACAGGATAA ATAACTTAAGCTGATGGTTTAGCAAGCAAACATCA TGGGTGTAACATGAAGATCTGAGAAGTGACTTCGG TCCAGGAAACTCA (SEQ ID NO: 25)	PRKCQ
T/NK	chr10:6592128- 6592406	CTAAAAATTACACCTTCTGCTCACTCTAATTTATTG CTGTAGAAGAAAGAATAAGTGAGATATTCCATTT CTAGTGACAGGTGGCTGGCACTTTGAAACCTTCCAT TTCATTACTCACCTTAATGTTTTCACTAAAACACAT GTGGTTTTCAAACACAGGAAGGAAAACATGGTAAC CTGTGGTTACAATTTCCACTAGAAAATAGAAAAGG TGTAGGTCAGAAAGAATGTTTGTGGGGTGTTCCTTT TTTACTTTAAACATGAAAACCCATGTCAG (SEQ ID NO: 26)	PRKCQ
T	chr14:99250860- 99251000	TTAAGAGAAAAAATAACACCCATTTATGTGACCA GTATTGTCTGTCTTTTTTTTAATCCAATAAACTTTC	BCL11B

		AACTACAATCGGTGCTGATGTCACCATGTTAGCGG CACACACTCTTGA CTCTGGTTTGCACAGTTCAC (SEQ ID NO: 27)	
T/NK	chr14:99253442- 99253634	CGGCGGAGGAGGGAAAGCCGAGCGCCAGGAAAAG CTCCTATTTGCAGCACACCTACCCCCACCGTGTGCC AGGCACTCATCATAAATGTCACAATGACAGATGAG GAAACCGCGGCTCAGAAGGTCAAGTGGCTGCCGGA GGCTGGCAGGGAGCAGGGTGGGGCTCTGACTCGGG CTGTGTTCTTTCCACA (SEQ ID NO: 28)	BCL11B
T/NK	chr14:99259222- 99259750	TGAAAACCACAGAGGAACGGCGAGAAGGAATGGG AGGGAGGAAAATACATTCCGTGGCAGTGAAGTTAT TGAAGTGCCAGAGCCAAAGAACAGATAATTTAAGG AAAAAATTCTGTGGCATCTCCCATCCTACACATAA ATCACTGTTCTCTATTTTCTGAACACGAGCCTATGC AGGGCCTAGGAGAGTCCATGTGTGAACTGAATAC AGAATATACGACGATGTAAGACGTACAACGCGCAC GTATGAACTATGTGTGAATAGGTAGCGACGTAGGT ATCGCTGAGAAGAGAACTACAATTTGAGATCCCA CCTGTGGTTACAGAAAAGCAGACAGAGCCCTCGAT GAATTAAATGCAGAATGCATCAGAAATGTGGCAGT ACAGAAACGCCCCGCAGACGAGGAAATCCTAAATC TGTTGTCTGCATCTCTCTAAGAAAAAGAACCTACA AGGTAAAGAAACAGTCCTCACAAAGCCGGTCCCAG AAACCATTAATTACACTTTAGAAAGAAATAGGAGT TTA (SEQ ID NO: 29)	BCL11B
T/NK	chr14:99260500- 99261397	AATTTCAAAC TCATTTTCTAATTCAAAAGAAACACA GATGAATTTAAAAATTAGCAGAGGTCACACGTGCC TGTTGCAAGCACCCCTCCTCCTCAGCTTCGTCTTT TGCCAAGACTATGTACCAGCACTTTTTCCTTTCTCT CCTCTTTTTTTTATTTTTTTATTTTTGGTAACATCTG GTATTCTTTCCTTTTTTTGGCAGTCTCTGCCTTTTCA CTTTCCTCATGCAGCAGCCCTGCGAGCCCCCGTAAT TGAGTTTGAAGGTGTCCAAAGCCGTTTGCTGTGCTG CAGCTCTGATTTCTGCGTCAAGTCCTAACAGCCAAC CAACCTGGGAGCCAGGCCCTGTTGGCGTCCCCGAG ACAGCCCCGGGATTATCCAGGCCTCCAGGGCTCAG TTCTGAGCTGGGATCTCCACGTCCCAGACCAGAGA TCCAAC TCACTGCCTCTAAGGGAGTCTGGGAGGAA AAGAAACAAACAAAAAATATCTCTTCCCTCCCA CTTTCAGCGTTGAAAGTTAAACCCCTGAGATGACA	BCL11B

		GGGTGTTACCCGATTCCAAAGAACGGGGTTTCCT CTCCCCACCACCCAGGCTGTGGCGCTGTGCCTTGGC CTGCTGTGTGCGACACTTCCCAGGAAGGTAGCAAG GTCACCCTCAACATCAGGCAGCAGAGTCACCCCCA GCCCCAAATTTCTGGGTCAGAGTAAGTGGACCAAG TGGGCCTGAAAGCTCACGTTCAAGGCCTTTGTAGA CACCCCCAAAGACTGTGGTTTCACTTCCGCTGGCAG GCAGATACCAAGCTAGGCGTGTAGGGTGCCTGCAT ATGTGTGCATGTGTCCCTCCTTAGAACTGTATCGAT AATGGAAGAAATAAAAGGAGAAAGCCAAGCCCTG GGAAGGGCAA (SEQ ID NO: 30)	
T/NK	chr14:99269613- 99270139	TGGTCTCTATGCTGGGTTTTAGGGGAGGGGAGAA CCACTTTATATATTTATTTATTTATTAAATTTTTTA AAATATAACATAAATATTCGGCTCTCGGCCGCCCCG GCAGCCAGTCCTCTGCGGTGACTGGGCGCGCAGCC CTCTCGAGCTCCGCGCGGGCAGCCCCGGCCCCAGCC CGGCGAGGTGCGCGGCGGATTGCAAGCATATAACC TGCCCGCGGTCTCGATGGCACCCAGAGGATGTTTT ATTTCTATTGCAGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAGGAACGGCGACCCAGGCAC CGCGAGAGAAAGAACGGCGGGGAAATGTTGCGCGC GCAGCGAAGAAGCCGCCCCGCGGGCTGCGGCGGG CGGGGAGCGCCGCAAAGCCACCTTCCCGGTGCAAG TGTGCGGGGACTCGGGGCGGGTTCCCCTGCAACA CCGTACCTGGCCCGCTCGCGCTCGCTTTTCCCCTCT GCTAAATAAACCCAACAGGGACGGTGGAAGCTGCT G (SEQ ID NO: 31)	BCL11B
B-cell	chr15:70319616- 70319805	CAGCTAGTGGGTGGTGGATCCGTGCTCTTGACCAC CCCCTCTGTTGCCTTTCTGTTAGACAACACCTTGT CTACTTTCTCTTCCCCATTTACAGATGAGGAGACA GGACCGGAACTGTGAGGACAATCTGTCTATAGTTA GGCAGTGAGCTGACTGCAGACTCAGGCTCTCCTGG GACCCTCTTCAG (SEQ ID NO: 32)	intergenic
CD8	chr16:56708539- 56708977	GCAAAAAGGCAGGGGCTGCAGGGGACTTTATAAA GTTGTGCTGTCTGGGCTGAAGGCTTGACAGACAGGA AGCTTGGGTGCAGGTGGGCTGTGAGCTGAATGCTT GCAACAGGATGTTTGGGTGCTAGTGAGCTGTTTGCT GTTGACCCTATTTCTCAGAACATTCACTCCCCTCTA CCCCTGTGTCTGTTCTTGCCAGCTAAGCTCATTTCC AATTTTCTTTTAGCTCCTTAGGGCTCCACATGCGTG	intergenic

		ACTTATTAGAGGAGCAAAAGAAGCCGAATATGGAA GGGGAAAGCCTTGGCCTGATCCAGGGTGCTCTAGA ACAAATTCTCCCACTGAACTGTCCTGCTGTGGGGC AAGCAGGTGAGCACTTGTTCTGTTGTCAGTCACCAT TTGCCCCCGGGGTGGGGTGTAACCTGCCAGGCATC CTCAAGGGATGCA (SEQ ID NO: 33)	
CD4	chr16:84766016- 84766317	CCCCAGGCTGGTATTTCACTGACACTCTTAGTCTG TTGTTGTCCCAAATGCTGCGTACCTGAAAGAAAGA GCACCCCTTTTGAGGCATCAAGACTTGATTCACTCT CAGTTCTGAGACTGAATCAACAACCTTCAACAGGT GAATAATAAGAACCTCAGAAACCTGCGCTGACGCC CTCAGAAGCTGGTTTCCCGTCCTCTGTGGAAGTGGA TTTAGAAGCCAGTTGAGCAGCCATGTGACCTTGAA CAAGTCACTTCTGTGTTCTGCACTGTGAGCTCTATT CCACTGGCCCCTTTCTA (SEQ ID NO: 34)	USP10
CD8/NK	chr17:35890611- 35890953	TGAACCCAAGACTCTACAACATCCTGGCCTCGATTT TTGGTCCAGCTCTGGTTGGTTCTTTCTGTGTTATTCT GTTCTGCTCCTCAATTCCTCTCCCCTCCCCTCCCCT CCTCTCCCCACCCCTTCCCCACCCCTCCCCTCC CCTCTTCTGTCACCTTGCACTGTGCACTTTAATGCA CATTGCACTATGTCAAGGTACTAACTTTGACAACCTG CTCTCATAATTCCAACCACATTCAGGCTGAGGGTTG CAGCTTGGCTCCCCCTCACTCTTCTCACCTTCACCA CACAGGACATTGGCTGTGCACAGCCACTTGTTTATT GCAGCTGGAGACCACA (SEQ ID NO: 35)	intergenic
T	chr18:13274085- 13274184	CTTGCTGGCTCTCCTCGGTGGCTTCCTCTTGAATGA ACCTTTCTTCTGAAGGCTTGATTTCTTCCGGGAGG CTTAGTGTTTCTGCTCAGCCTTCTTTC (SEQ ID NO: 36)	LDLRAD4
CD4	chr18:13276705- 13277363	TCTGTCACCTCCCTCGTTGCGGACTCCTATGTAGGTC GCCTGGTGTGGGGAGAAGCATTCTTTGTGGTATTCTG GTTGGGTAGAAGCCAATCACAGCTTCCACCTACAC TCAAGGGGAGGGAGTTGTACAGGGTGTAAGCAATT TGGGGAGTCACCTTAGAATTCTGCCCACCACAGTA CCTTTCTGGTTATTTTCATGGACTTCCGTTCCCAAGA AATCTGAGCGTTTTCGTCCTAGGAAGACTGGTGAG AGCAGCCCCAGTGAGGAATAAAAACTAAGATCTG GAAAATCAGCAGTGGGTTGTTTTCATCTCTCAGCAG GCAGGAAACAGGAGGAGAAAGGAATGTCTGTAGG CTCCCAACACTGATGGGAAGGAGGTGTTTGGCTGG	LDLRAD4

		GGTAGAGCTCCGCAGGAATCTCCCAGGCTCCTCTA GCTAGGTGCAGCCGTGTTTTATCCGGCTGTCTTTAC ATGGGCTGATCACTCAGGAGTGGCATATGGCAGGA GCACGCTTTGGGGTACGAGCCTCCTGGAGAATGAA CTGCAGCACACAAGCCAGACAGATGGTGGCTTAGT CCCCCTTGGACAAGAGTGTGTCCTGCACACTGGAG GGCGGGGTGCTGAGAGGCGCTTGTGGTGTCTGAGG CCGAGCTTTGCTGAGTTCACCTGA (SEQ ID NO: 37)	
CD4/NK	chr2:147449478- 147449829	TGAAAGAAAGAGAATAAAGCACTGGGCTTTGCAAA CTAGGCTAAGGCCCAAACCACAAGATTATCTTGA TGCATGTGATTGGGAAGGAGGACTAATTAGAAGAG AGGATGTCATTTTATTTTCTAACCAGCCCTCTCTGA TCTGAAGCCATGACACCCCCTCACTTGTTACCTAGC AACCCTTCTTTGTATATGTAAGGTTACTTCATTCT GCATTGTTATTCAATTTATTTGCCATTTTAAGTGTCT TGATCCTCTCTAGGATCACCCCTGGTGTGATTGGCTG GCATTAGTCTCTAAAATACCGGAGGGCAGTCTATT AAGTGGATCCAAATGTCATTGTACAGCTCA (SEQ ID NO: 38)	intergenic
CD8/NK	chr2:181142700- 181142853	CTGAGATGTTCGTAGTATTGTCATCTACATTTCTATA GAAGAAGAACTGAAACAGGTTAGGTAACCTACTC GTGGTCACAGAGGTAATTGGTGGATTTGAGGATTC ACAGGATTCTAAAATCGAGTTGCTGCACTGCCTTCT TTAAAAAATTA (SEQ ID NO: 39)	intergenic
CD8/NK	chr2:86793857- 86794067	TGTCAGCCAGTGGGGTGGCAGCCCCTTTGTACAGA GCACCATGGGGTGGGGTGGGGAGGATAAGGCA ACATGTCAAACCCATCAAGGAGGCTTTGTGACCCC AGTGATATTTTTTGACAACGTGGTGGATTTTCGAT GTGACCACAATGACATCCGCCTTGCAGTGGCAGAA CAGATGCAATTGCACAAGTTCTGGAGAACTTTCT (SEQ ID NO: 40)	CD8a
CD8/NK	chr2:86794937- 86795091	TGCTCTCTGCTTACCAAACCTCTCCCTTAAGACC CAGCTCAAGCATCTCCTTCCTGTGGGGTTTAGCTCC TTCCCCCTCCCACTCCCAGACAGTACAGACCACATC CTTCTCTTCTGTGTACCCGGACCTTGGGTATCT GCAGACTGGA (SEQ ID NO: 41)	CD8a
T	chr20:21548472- 21548637	TAACCTAAGCGTGTTGGTATCTCTGTTAGTGGTGAA GTCGGCTGCAAACCACAAAACACCTGACTGCTACG GAAGATATTAACAGGGACTTTTTTCCTTCTGCATAA	intergenic

		CAGGAAGTCTTGAGTAGGTAGTCGAGGTTGGGTAG AGGACACTTCTGTTTCAATTCTA (SEQ ID NO: 42)	
CD4	chr20:52975358- 52975749	GCATTGCTCAGAATTGCTCGACTTTGATTATAATTA TCCTACGATCGATAAGGATCCAGGTGTACGTAACA TAACACTGTATCACATTATTTAAATCAGGTCCTTTT CATTAAAGCTGTGTCTGTTGGTGCTGGCTAGTTTATT GGTGTGTGTGGGTGTGTGGGGGTGTGTGTGTGTGT GTGTTAGAACTTGTAAGTATAGTTTCAGTTTTCTG GCCTATTATATTCCTACTGTCTTTGTATGTTTGT GTATGATTCTTATTATTTTACCAGAAAGCGGAAACC CTTTTAAAGCTGAAAAAGGATGATTCATTTTCGTACA CAGTGAGGGCCCTCTTACCTTATTTATTTGCTCACA TATTAATAGAGGAGACAGTTTTTCATGCAGTG (SEQ ID NO: 43)	intergenic
B-cell/NK	chr20:57682799- 57683080	TTCTGCATGAGCAGGCCCGCTGAAAAGGAAGGCG GCTCGCCAGATTTGTTTCGAATTATGAAAATAGATG TTGTCTCCCCACCACATCTGTTTTGCCTGACAAATG AGCAGCAGCTCGCCTCCTAAATAAGGCAGCACACC AAGACGGTCTTGAACTCCGGCTTCTCCAACTCTTC AGAAAAGGAGAAGAAGAAGAAAAAGAGTCCAAG CCTCCCAGGTTTGAGCTCTAAAAGCCAGACCTTTTT CAATGTCATCTCTCACGCCGCAGTCTCCGGGGG (SEQ ID NO: 44)	PMEPA1
CD4	chr22:42183675- 42183793	TATTAACAAGTTTGTGGTAAGGTGTTATGACAATG ATAGAAAATAATACACGGGGATTTCCCAAGACTC TCAAGTGATTGTTTATTTTCTTTTAGGTTCTTTTTT TTTTTTTTTGA (SEQ ID NO: 45)	TCF20
B-cell	chr7:1022952- 1023453	GCCGGCTCTGTCGTCGAGGCGCTCACAGGCAGGCA CACGTGAGCTCCTGGAGGACAGGGAGAGCGGCCGC CCCGCCCCTGCGGAGCACAGGACGCTTCCTGCCAC CCCTGCAGAGCATGGGACGCTTCCTGCCATGGTGC CGTGGCAATGGGTGGCACCTGCCTGTGGCCCCTTCT CAGAAGGACGTTTTAAACGCGTGAGGTCTGATGCA CAGCCACAGGGAGACACAGACGAGCAGATGTGGG CATCCGAGTATTTACAAGGTCTGGTGGCTCCTGCAG CCGCGACACGGGCTGAGCGCAAGTGATGTGTGAGG TGTCCCCAACAGATGGCACGGGGAGCGCCACACC CGCCACCGCGGGGTCTGCGGAAGCTCGTGTGAGCT GGAGGTTAGGGAAGACGCACAGGGGCTCATTCTCC ACCCAGGTTCAAACCTCCCTGAACTCACGAGACCCA	C7ORF50

		GGCTGAAGACATGGACAGACTCCCAGCCCCAGCGC CCCTCTGAC (SEQ ID NO: 46)	
CD4/NK	chr7:70788396- 70788551	CTGACTGATAAAAGAAAAACAAATTTTCCTTCAAG GCAGTATGATAACAATCTCTTAACCACTGGGAGGA ATGTTTATGACATTCATCTCTGAGCTGTGAACTGCC AAAATGAGGCACGCCTAGCAACATAACCTGGCCGA CCCTAGGCCGCGAG (SEQ ID NO: 47)	AUTS2

Repeated motifs/domains in the sequences are underlined

Example 3: *In vitro* validation of a T cell-specific promoter construct (Chr16-445, SEQ ID NO:7)

A T cell-specific synthetic promoter was created by the juxtaposition of a selected enhancer sequence identified above and a minimal promoter such as CMV. The pENTR1a-Chr16-445-minCMV-GFP-SV40polyA vector was transfected in a T cell line (Jurkat) and myeloid cell line (K562), and GFP expression was only detected in the Jurkat T cell line by flow cytometry. In opposition, when transfected with a vector coding for a non-specific strong promoter (spleen focus-forming virus (SFFV) promoter) instead of the Chr16-445-minCMV promoter, both cell lines expressed GFP (**FIG. 3A**). Then, human PBMCs were transfected with the T cell-specific synthetic promoter and it was observed that GFP protein was only expressed in T cells, but not in monocytes or B cells (**FIG. 3B**), whereas all cell types expressed GFP when the PBMCs were transfected with a non-specific promoter.

Example 4: *In vitro* validation of a NK-specific promoter construct (NK6, SEQ ID NO:11)

A NK cell line (NK92), myeloid cell line (K562), B cell line (697) and T cell line (Jurkat) were transfected with the pENTR1a-NK6-minCMV-GFP-SV40polyA vector. The NK6 synthetic promoter induced the expression of the GFP only in NK92 cells, whereas the SFFV strong promoter resulted in GFP expression in all cell lines (**FIG. 4**), confirming the specificity of the NK6 promoter.

Example 5: *In vitro* validation of another NK-specific promoter construct (NK8, SEQ ID NO:14)

The NK8 sequence specificity was tested in an OP9 co-culture system with CD34⁺ cells transduced or not with the NK8-minCMV-GFP-SV40polyA or the SFFV-GFP-SV40polyA. GFP expression was observed in the NK cells, but not in the B cells, harvested after co-culture in the well containing the NK8-transduced cells (**FIG. 5**). Cells transduced with the strong unspecific promoter (SFFV) led to both NK and B cells expressing GFP, while untransduced cells were not GFP positive. These results provide compelling evidence that the NK8-based synthetic promoter is specific to NK cells.

Example 6: *In vitro* validation of a B cell-specific promoter construct (SEQ ID NO:23)

A B cell line (Nalm6) was transduced with a BaEV-LV particles coding for the Benh-minCMV-GFP-SV40polyA. The B cell-specific synthetic promoter was shown to induce the expression of the GFP

in the B cells (**FIG. 6**) suggesting that this promoter can induce the expression of a protein of interest in a B cell-specific manner.

Example 7: *In vivo* validation of the T-specific promoter construct (Chr16-445)

Human CD34⁺ cells were transduced with the Chr16-445-minCMV T cell specific promoter or the non-specific SFFV promoter and engrafted in NSG mice with or without the co-engraftment of human thymus (huNSG and BLT models, see methods). In both models, the development of GFP⁺ T cells was observed, while no other human cells expressed GFP (**FIGs. 7A, B**) when CD34⁺ cells were transduced with our Chr16-445-minCMV T cell specific promoter. In contrast, all lineages expressed GFP when CD34⁺ were transduced with the non-specific strong promoter SFFV (**FIG. 7C**). These results also show that engineered HSC are able to differentiate into various lineages both myeloid (monocytes) and lymphoid (T and B cells).

Example 8: *In vivo* validation of a NK-specific promoter construct (NK8)

Human CD34⁺ cells were transduced with the NK8-minCMV driving the GFP expression to test the specificity of NK cell specific promoter *in vivo*. Human NK cells expressing the GFP were found in blood, spleen and bone marrow of mice (**FIGs. 8A, B**). In contrast, very few human B and T cells harvested from the same mice expressed the GFP, witnessing the specificity of the NK8 synthetic specific promoter.

Example 9: *In vivo* validation of a B cell specific promoter construct (SEQ ID NO:23)

Human CD34⁺ cells were transduced with the Benh-minCMV driving the GFP expression to test the specificity of B cell specific promoter *in vivo*. Four weeks after humanization, human cells circulating in the blood were analyzed by flow cytometry. At this timepoint, only B cells (CD19⁺) and monocytes (CD14⁺) are developed in the humanized mice. While the strong unspecific promoter (SFFV) induced the GFP expression in all cell subtypes, GFP positive cells were only found in the B cell population (**FIG. 9**). These results suggest that the B cell synthetic specific promoter is induced specifically in the B cell population.

Example 10: Functional validation of the T-specific promoter construct (Chr16-445)

The therapeutic potential of the construct was explored through cytotoxic assays using CAR-CD33, CAR-CD22 or CAR-GD2. A sequence encoding a CAR-CD33, CAR-CD22 or CAR-GD2 was put under the control of a strong non-specific promoter (SFFV) or under the control of the synthetic T-cell specific promoter (Tenh Chr16-445). Its ability to drive the expression of a functional transgene was assessed by transducing primary T-cells with the CAR and performing cytotoxic assays against human AML cell lines expressing or not CD33, against human ALL cell line expressing CD22 (RS4;11), or against a GD2⁺ neuroblastoma (NB)-cell line (SK-N-DZ). Primary T-cells transduced with the CAR-CD33 construct under the control of the non-specific SFFV promoter or the T-cell specific promoter showed

CAR-CD33 expression, as confirmed by flow cytometry (**FIG. 10A**). The results of cytotoxicity experiments show that the CAR-CD33 construct efficiently triggered lysis of CD33⁺ AML cells, even when its expression was driven by the specific T cell promoter (**FIG. 10B**). Unspecific lysis measured in CD33⁻ cells (right bars) was minimal and significantly lower than CAR-mediated lysis (** $p < 0.001$). Similarly, CAR-CD22 expressed under the Tenh Chr16-445 promoter induced a CAR expression strong enough to induce a similar CAR-specific cytotoxicity against RS4;11 ALL-cell line to that of SFFV (strong) promoter (**FIG. 10C**). Similarly, the results depicted in **FIG. 10D** show that in a context of solid tumor, a CAR-GD2 expressed under the Tenh Chr16-445 promoter construct also induced target lysis at levels significantly higher than untransduced primary T cells (**** $p < 0.0001$), and comparable to the levels of a CAR-GD2 driven by the strong unspecific promoter SFFV.

Example 11: Kinetic of expression during T-cell differentiation of a CAR under the T-specific promoter construct (Chr16-445).

Using OP9-DL4 cells to mimic *in vitro* thymic differentiation and using a CAR-CD22 construct, it was observed that the specific promoter induced the expression of CAR-CD22 early in the T-cell differentiation process (as soon as CD7⁺CD1⁺ stage) (**FIG. 11A**). As a control, HSC engineered cells were co-cultured with OP9 cells, which results in B cell differentiation, and no CAR expression was detected (**FIG. 11B**). This data further evidences the specificity of the T-specific/Chr16-445 synthetic promoter. The results depicted in **FIG. 11C** shows that the Tenh Chr16-445 promoter is active in all stages of T cell differentiation: in pro-T, CD7⁺, CD7⁺CD1a⁺, CD4⁺CD8⁺ double-positive, as well as CD4⁺ and CD8⁺ single-positive T cells. Similar results were obtained when Chr16-445 was inserted in the reverse orientation, confirming that this sequence shares this feature of transcription enhancers (i.e. orientation-independent).

Example 12: *In vivo* T-cell differentiation of CD34⁺ cells transduced with a CAR under the T-specific promoter construct.

The *in vivo* T-cell differentiation of CD34⁺ cells transduced with a CAR was assessed in a mouse in which transduced CD34⁺ cells were engrafted along with a fetal human thymus (BLT model). Blood sampling of the mice 30 weeks after humanization shows that T cells expressed the CAR-CD22 at their surface (**FIG. 12**). Consistent with the previous findings, B cells and monocytes did not express the GFP. Again, similar results were obtained when Chr16-445 was inserted in the reverse orientation. These results confirm the specificity of the T-specific/Chr16-445 promoter, but also suggest that thymic selection does not interfere with CAR-positive T cell development.

Although the present invention has been described hereinabove by way of specific embodiments thereof, it can be modified, without departing from the spirit and nature of the subject invention as defined in the appended claims. In the claims, the word "comprising" is used as an open-ended term, substantially

equivalent to the phrase "including, but not limited to". The singular forms "a", "an" and "the" include corresponding plural references unless the context clearly dictates otherwise.

REFERENCES

1. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2010;363:355-64.
2. Hacein-Bey-Abina S, Pai SY, Gaspar HB, et al. A modified gamma-retrovirus vector for
5 X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2014;371:1407-17.
3. Lizio M, Harshbarger J, Shimoji H, et al. Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol* 2015;16:22.
4. Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, et al. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* 2014;507:455-461.
- 10 5. Boshart M, Weber F, Jahn G, et al. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 1985;41:521-30.
6. Ede C, Chen X, Lin MY, et al. Quantitative Analyses of Core Promoters Enable Precise Engineering of Regulated Gene Expression in Mammalian Cells. *ACS Synth Biol* 2016;5:395-404.
- 15 7. Matsuda K, Mikami T, Oki S, et al. ChIP-seq analysis of genomic binding regions of five major transcription factors highlights a central role for ZIC2 in the mouse epiblast stem cell gene regulatory network. *Development* 2017;144:1948-1958.
8. Levy C, Amirache F, Costa C, et al. Lentiviral vectors displaying modified measles virus gp overcome pre-existing immunity in in vivo-like transduction of human T and B cells.
20 *Mol Ther* 2012;20:1699-712.
9. Humbert JM, Frecha C, Amirache Bouafia F, et al. Measles virus glycoprotein-pseudotyped lentiviral vectors are highly superior to vesicular stomatitis virus G pseudotypes for genetic modification of monocyte-derived dendritic cells. *J Virol* 2012;86:5192-203.
- 25 10. Girard-Gagnepain A, Amirache F, Costa C, et al. Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood* 2014;124:1221-31.
11. Lowe E, Truscott LC, De Oliveira SN. In Vitro Generation of Human NK Cells Expressing Chimeric Antigen Receptor Through Differentiation of Gene-Modified Hematopoietic
30 Stem Cells. *Methods Mol Biol* 2016;1441:241-51.
12. Huang J, Nguyen-McCarty M, Hexner EO, et al. Maintenance of hematopoietic stem cells through regulation of Wnt and mTOR pathways. *Nat Med* 2012;18:1778-85.

13. Markert ML, Devlin BH, McCarthy EA. Thymus transplantation. *Clin Immunol* 2010;135:236-46.
14. Kalscheuer H, Danzl N, Onoe T, et al. A model for personalized in vivo analysis of human immune responsiveness. *Sci Transl Med* 2012;4:125ra30.
- 5 15. Laing AA, Harrison CJ, Gibson BES, et al. Unlocking the potential of anti-CD33 therapy in adult and childhood acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 2017;54:40-50.
16. La Motte-Mohs RN, Herer E, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro. *Blood* 2005;105:1431-9.
- 10 17. Halkias J, Melichar HJ, Taylor KT, et al. Tracking migration during human T cell development. *Cell Mol Life Sci* 2014;71:3101-17.
18. Kurd N, Robey EA. T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol Rev* 2016;271:114-26.
19. Poulin JF, Sylvestre M, Champagne P, et al. Evidence for adequate thymic function but
15 impaired naive T-cell survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2003;102:4600-7.
20. Dion ML, Poulin JF, Bordi R, et al. HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity* 2004;21:757-68.
21. Sportes C, Hakim FT, Memon SA, et al. Administration of rhIL-7 in humans increases in
20 vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *J Exp Med* 2008;205:1701-14.
22. Kershaw MH, Westwood JA, Darcy PK. Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2013;13:525-41.
23. Porter DL, Hwang WT, Frey NV, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce
25 sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med* 2015;7:303ra139.
24. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest* 2011;121:1822-6.
- 30 25. Maude SL, Teachey DT, Porter DL, et al. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015;125:4017-23.
26. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014;371:1507-17.

27. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368:1509-18.
28. Haso W, Lee DW, Shah NN, et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2013;121:1165-74.
- 5 29. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2015;385:517-28.
30. Fitzgerald JC, Weiss SL, Maude SL, et al. Cytokine Release Syndrome After Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Crit Care Med* 10 2017;45:e124-e131.
31. Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, et al. Identification of Predictive Biomarkers for Cytokine Release Syndrome after Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Discov* 2016;6:664-79.
32. Jena B, Maiti S, Huls H, et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-specific monoclonal antibody to 15 detect CD19-specific T cells in clinical trials. *PLoS One* 2013;8:e57838.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A synthetic expression cassette for expressing a nucleic acid of interest in a cell comprising:
 - (i) a minimal promoter; and
 - (ii) a transcriptional enhancer operatively coupled to the minimal promoter for expression of the nucleic acid of interest in the cell, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 70% sequence identity with at least 50 consecutive nucleotides from any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
2. The synthetic expression cassette of claim 1, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 70% sequence identity with at least 100 consecutive nucleotides from any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
3. The synthetic expression cassette of claim 2, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 70% sequence identity with any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
4. The synthetic expression cassette of claim 1, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 80% sequence identity with at least 50 consecutive nucleotides from any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
5. The synthetic expression cassette of claim 4, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 80% sequence identity with at least 100 consecutive nucleotides from any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
6. The synthetic expression cassette of claim 5, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 80% sequence identity with any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
7. The synthetic expression cassette of claim 1, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 90% sequence identity with at least 50 consecutive nucleotides from any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
8. The synthetic expression cassette of claim 7, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 90% sequence identity with at least 100 consecutive nucleotides from any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
9. The synthetic expression cassette of claim 8, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 90% sequence identity with any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.

10. The synthetic expression cassette of claim 1, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 95% sequence identity with at least 50 consecutive nucleotides from any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
11. The synthetic expression cassette of claim 10, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 95% sequence identity with at least 100 consecutive nucleotides from any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
12. The synthetic expression cassette of claim 11, wherein the transcriptional enhancer comprises a sequence having at least 95% sequence identity with any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
13. The synthetic expression cassette of claim 1, wherein the transcriptional enhancer comprises or consists of at least 50 consecutive nucleotides from any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
14. The synthetic expression cassette of claim 13, wherein the transcriptional enhancer comprises or consists of at least 100 consecutive nucleotides from any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
15. The synthetic expression cassette of claim 13, wherein the transcriptional enhancer comprises or consists of any one of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 7-47.
16. The synthetic expression cassette of any one of claims 1 to 15, wherein the minimal promoter is a human cytomegalovirus CMV minimal promoter (miniCMV).
17. The synthetic expression cassette of claim 16, wherein the minimal promoter comprises or consists of the sequence of SEQ ID NO: 6.
18. The synthetic expression cassette of any one of claims 1 to 17, wherein the transcriptional enhancer is upstream of the minimal promoter in the synthetic expression cassette.
19. The synthetic expression cassette of any one of claims 1 to 18, further comprising a polyadenylation (poly(A)) signal.
20. The synthetic expression cassette of any one of claims 1 to 19, further comprising a transcriptional termination signal.
21. The synthetic expression cassette of any one of claims 1 to 20, further comprising the nucleic acid of interest operatively coupled to the minimal promoter and transcriptional enhancer.

22. The synthetic expression cassette of any one of claims 1 to 21, further comprising a selectable marker.
23. The synthetic expression cassette of any one of claims 1 to 22, wherein the cell is a stem cell.
24. The synthetic expression cassette of claim 23, wherein the stem cell is a hematopoietic stem cell (HSC), an embryonic stem cell, a totipotent stem cell, a pluripotent stem cell, a multipotent stem cell or an induced pluripotent stem cell (iPSC).
25. The synthetic expression cassette of any one of claims 1 to 22, wherein the cell is an immune cell.
26. The synthetic expression cassette of claim 25, wherein the immune cell is a T cell, a natural killer (NK) cell, or a B cell.
27. The synthetic expression cassette of any one of claims 1 to 26, wherein the nucleic acid of interest encoded a chimeric antigen receptor (CAR).
28. A vector comprising the synthetic expression cassette of any one of claims 1 to 27.
29. The vector of claim 28, wherein the vector is a viral vector.
30. A host cell comprising the synthetic expression cassette of any one of claims 1 to 27 or the vector of claim 28 or 29.
31. The host cell of claim 30, wherein said cell is a hematopoietic stem cell, a T cell, a natural killer (NK) cell, or a B cell.
32. A composition comprising the host cell of claim 30 or 31.
33. A method for inducing the expression of a nucleic acid of interest by a cell, the method comprising introducing the synthetic expression cassette of any one of claims 1 to 27 or the vector of claim 28 or 29 in the cell.
34. The method of claim 33, wherein the nucleic acid of interest encodes a protein that is absent or defective in said cell.
35. The method of claim 33 or 34, wherein the nucleic acid of interest encodes a chimeric antigen receptor (CAR).
36. The method of any one of claims 33 to 35, wherein said cell is a hematopoietic stem cell, a T cell, a natural killer (NK) cell, or a B cell.

37. A method for treating a disease, condition or disorder in a subject, the method comprising administering an effective amount of the cell of claim 30 or 31, or the composition of claim 32, to said subject.
38. The method of claim 37, wherein the disease, condition or disorder is associated with the absence of expression of a protein or the expression of a defective protein, and wherein the nucleic acid of interest encodes a functional form of the protein.
39. The method of claim 37, wherein the disease, condition or disorder is associated with expression of an antigen, and wherein the nucleic acid of interest encodes a recombinant receptor that specifically binds to the antigen.
40. The method of claim 39, wherein the recombinant receptor is a chimeric antigen receptor (CAR).
41. The method of claim 39 or 40, wherein the disease, condition or disorder is a cancer, an autoimmune or inflammatory disease, or an infectious disease.
42. The method of claim 41, wherein the disease, condition or disorder is a cancer.
43. The method of claim 42, wherein the cancer is a hematological cancer.
44. The method of any one of claims 37 to 43, wherein said cell is a hematopoietic stem cell, a T cell, a natural killer (NK) cell, or a B cell.
45. The method of any one of claims 37 to 44, wherein said method comprises administering at least 1×10^2 , 1×10^3 or 1×10^4 cells to said subject.
46. The method of claim 45, wherein said method comprises administering 1×10^6 to 1×10^8 cells to said subject.
47. The method of any one of claims 37 to 46, wherein said cells are autologous cells.
48. The method of any one of claims 37 to 46, wherein said cells are allogeneic cells.

ABSTRACT

New synthetic expression cassettes comprising a minimal promoter and a cell-specific enhancer for expression of a nucleic acid of interest in one or more specific cell subtypes are disclosed. Vectors and host cells comprising such synthetic expression cassettes are also disclosed. The application also discloses methods for expressing a nucleic acid of interest, such as a nucleic acid encoding a chimeric antigen receptor (CAR), in a cell and for treating diseases or conditions such as cancers and genetic diseases using the synthetic expression cassettes, vectors and cells.

Continued in FIG. 1B

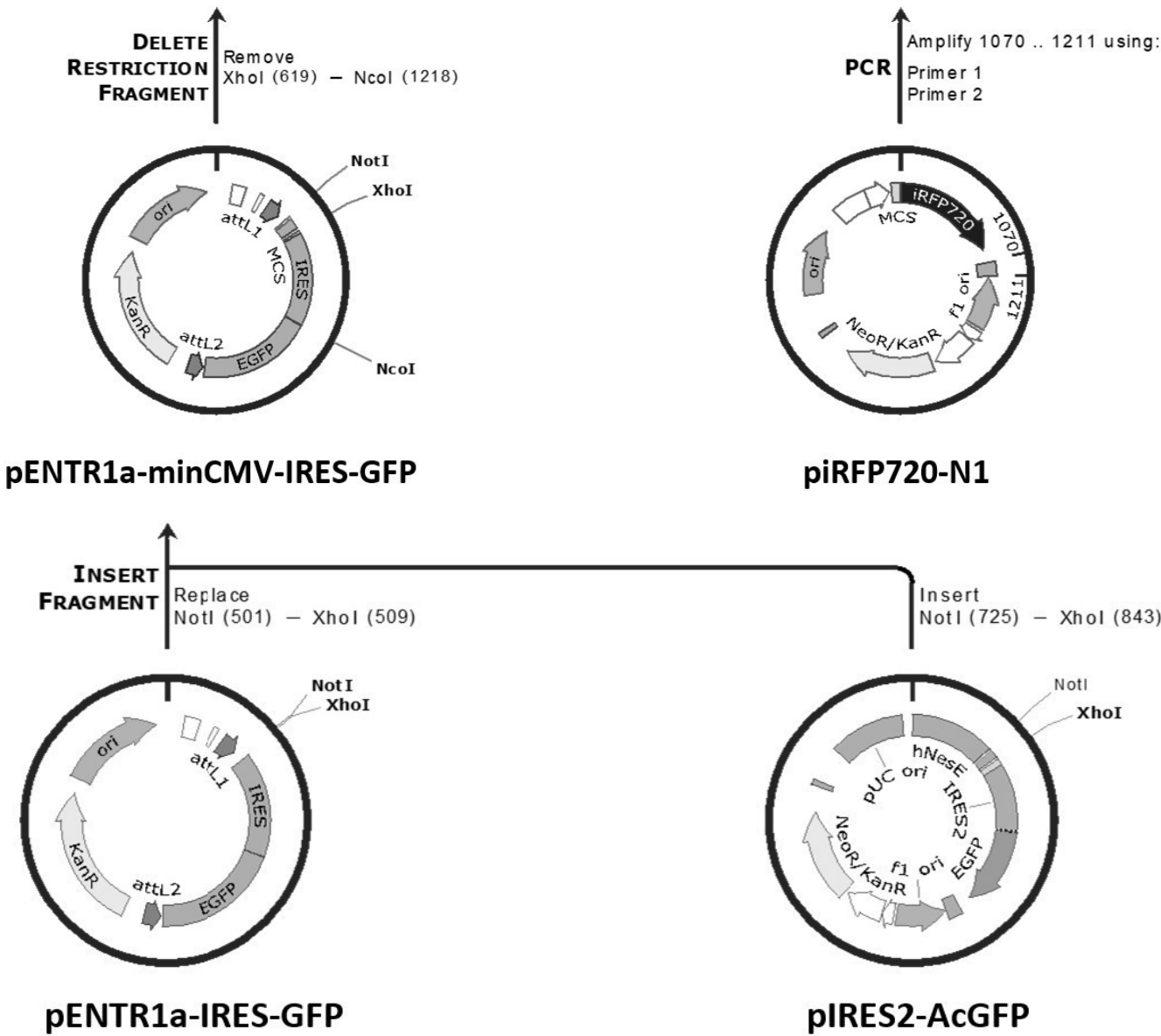


FIG. 1A

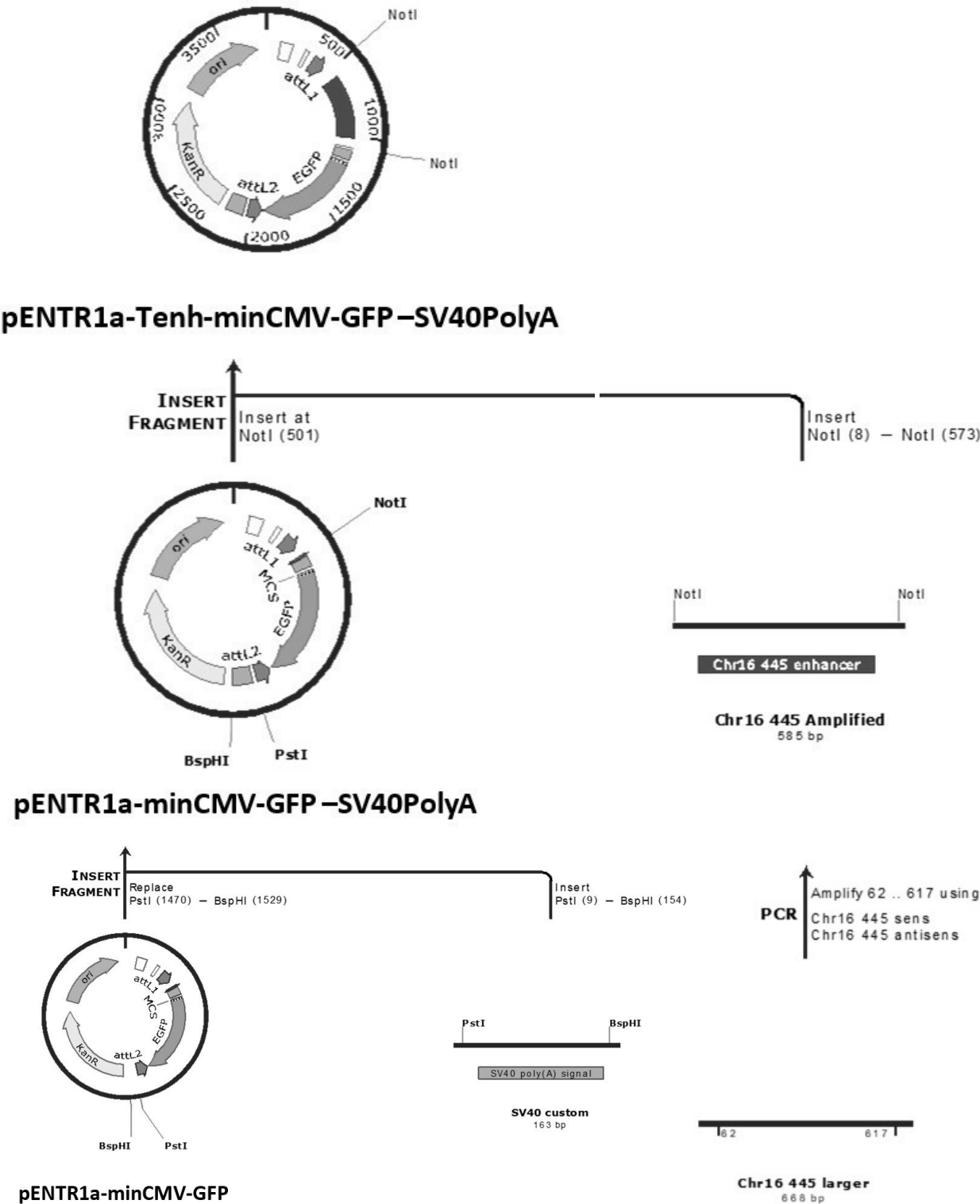


FIG. 1B

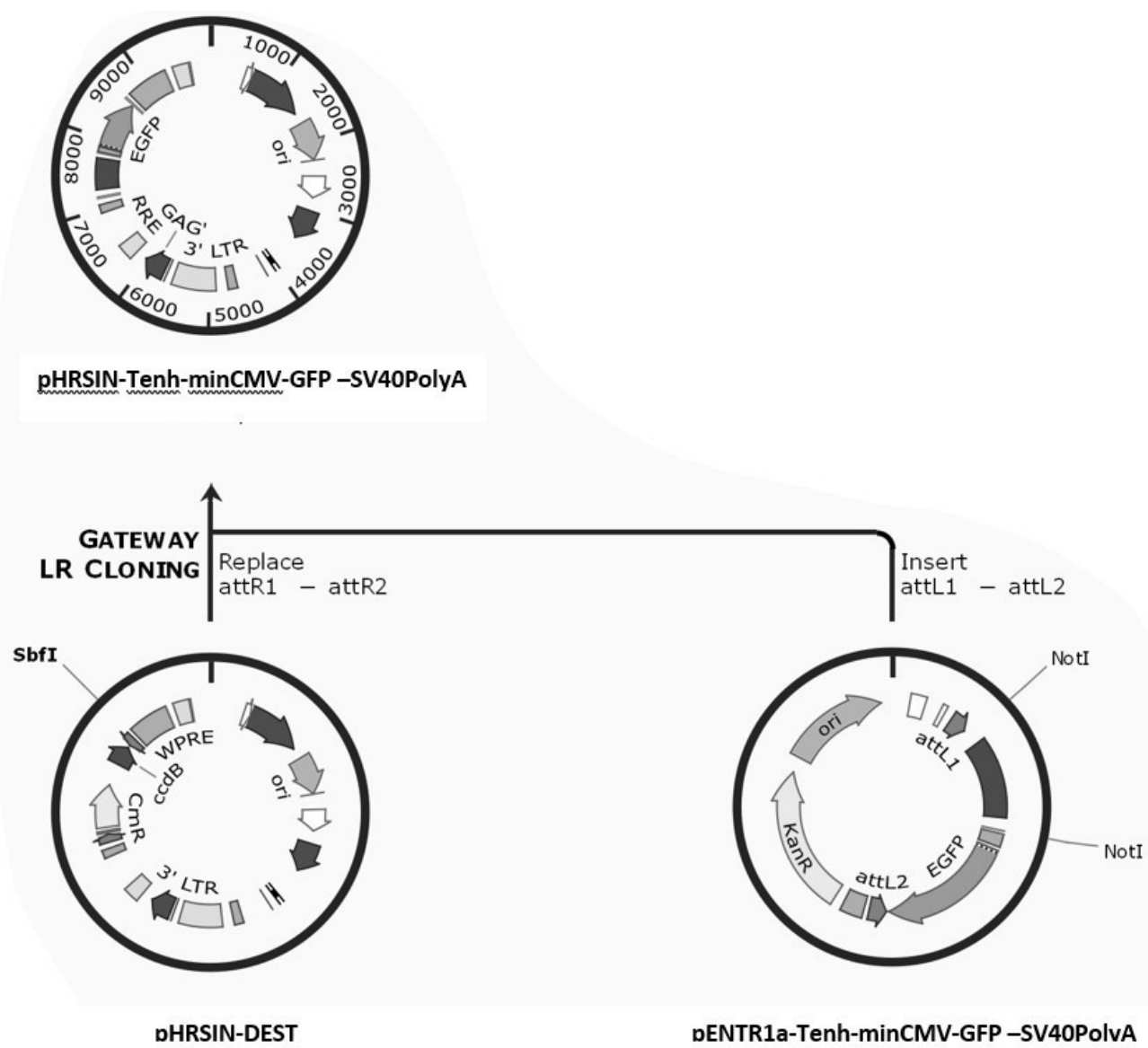


FIG. 2

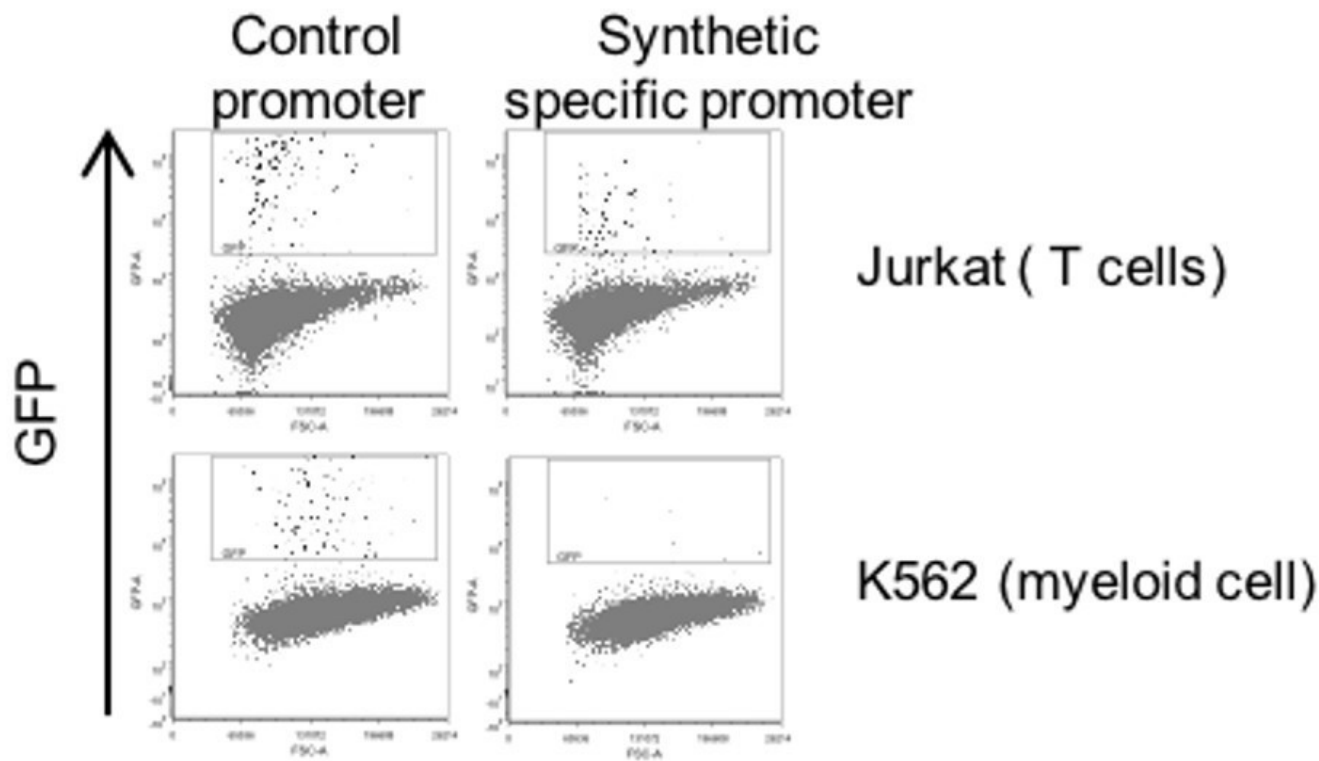


FIG. 3A

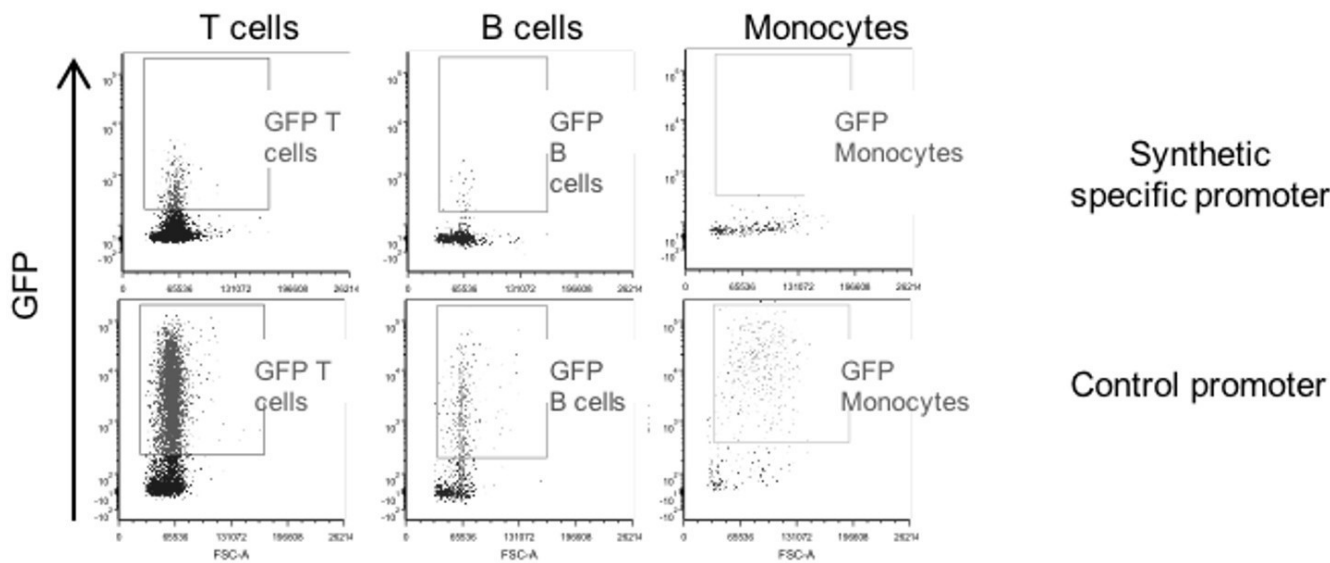


FIG. 3B

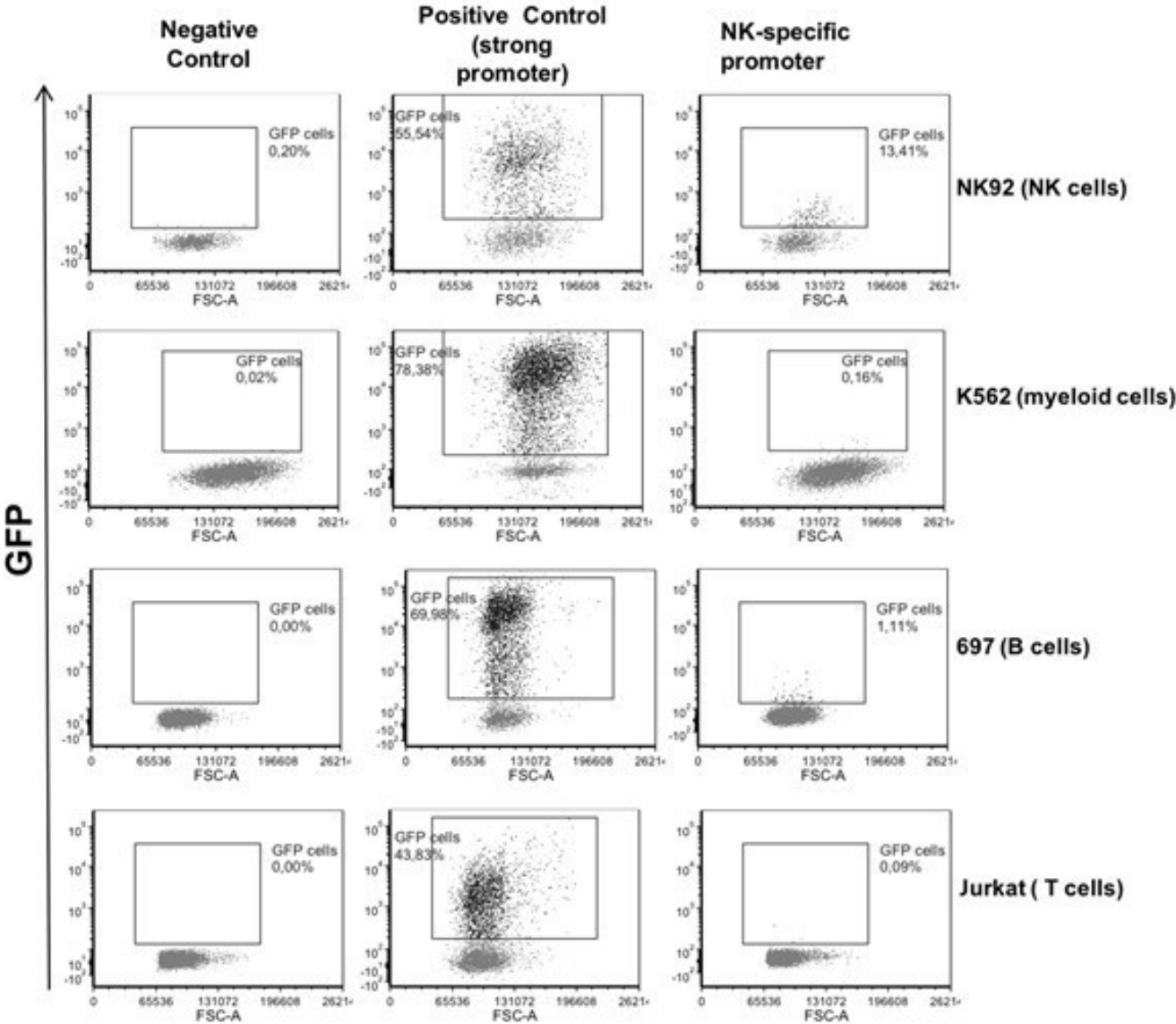


FIG. 4

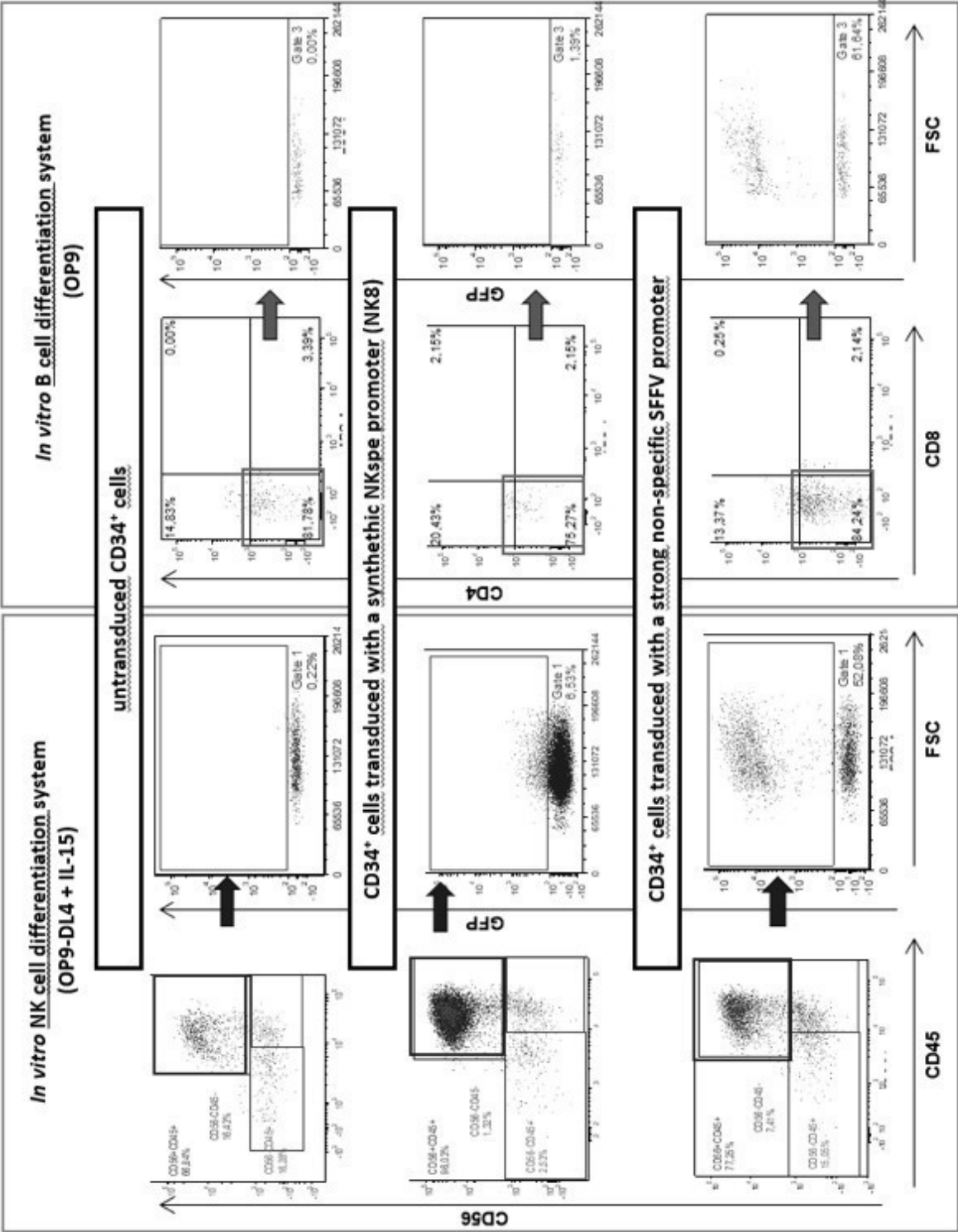


FIG. 5

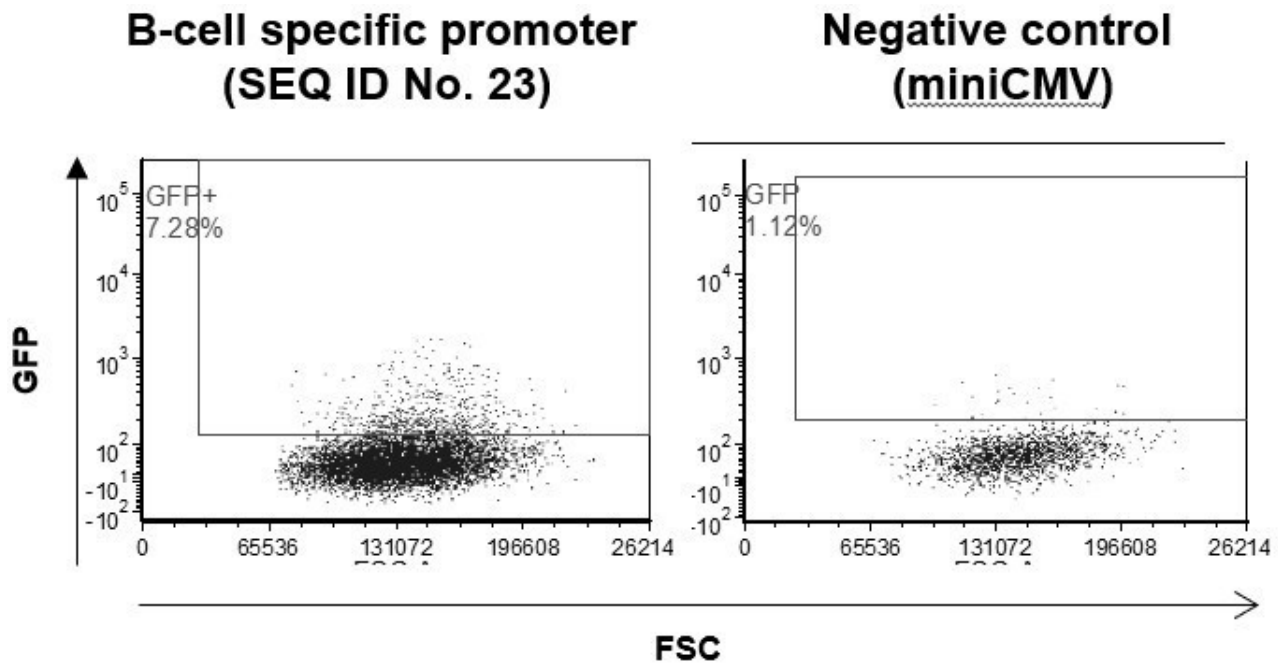


FIG. 6

huNSG mouse – specific promoter

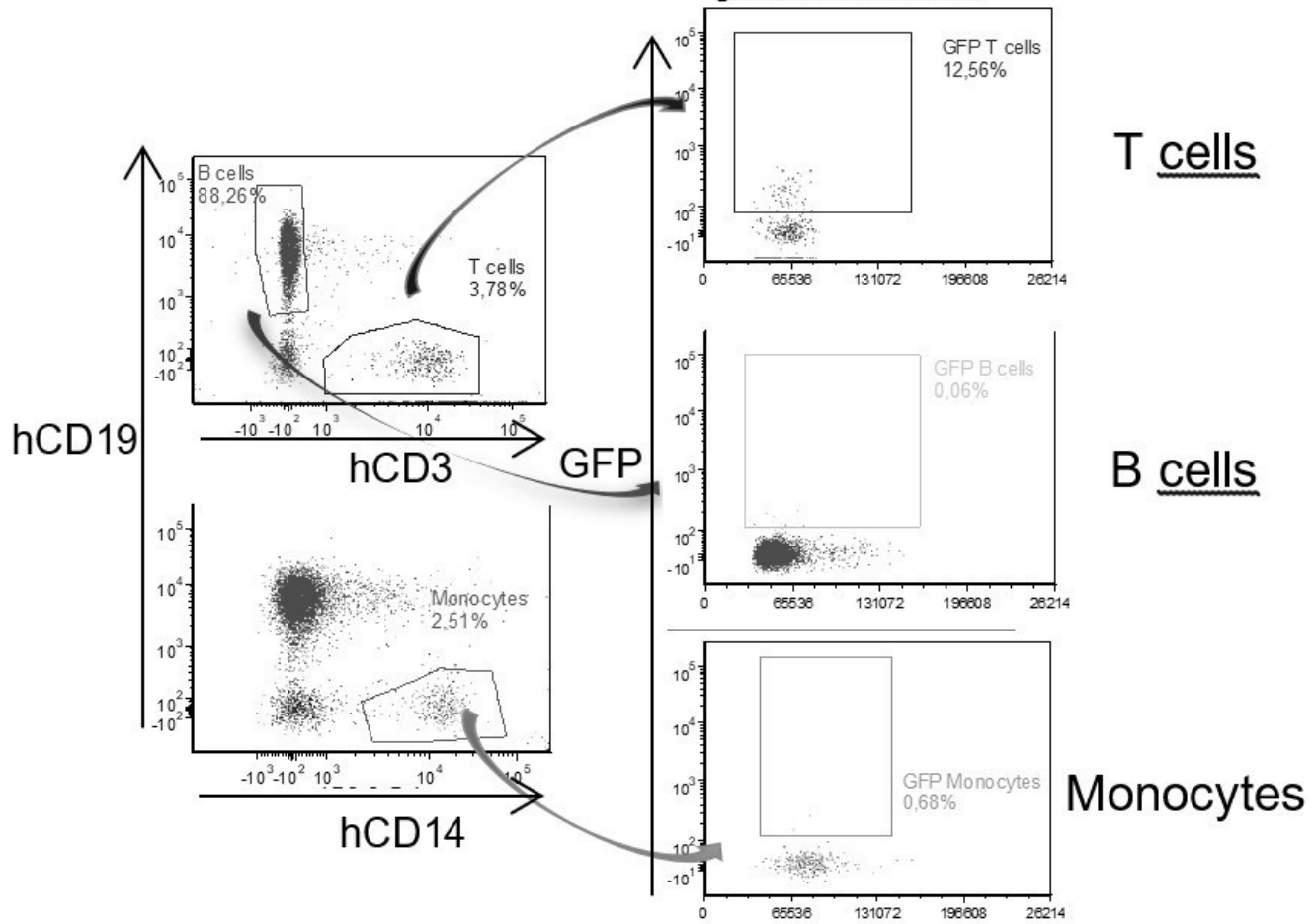


FIG. 7A

BLT mouse – specific promoter

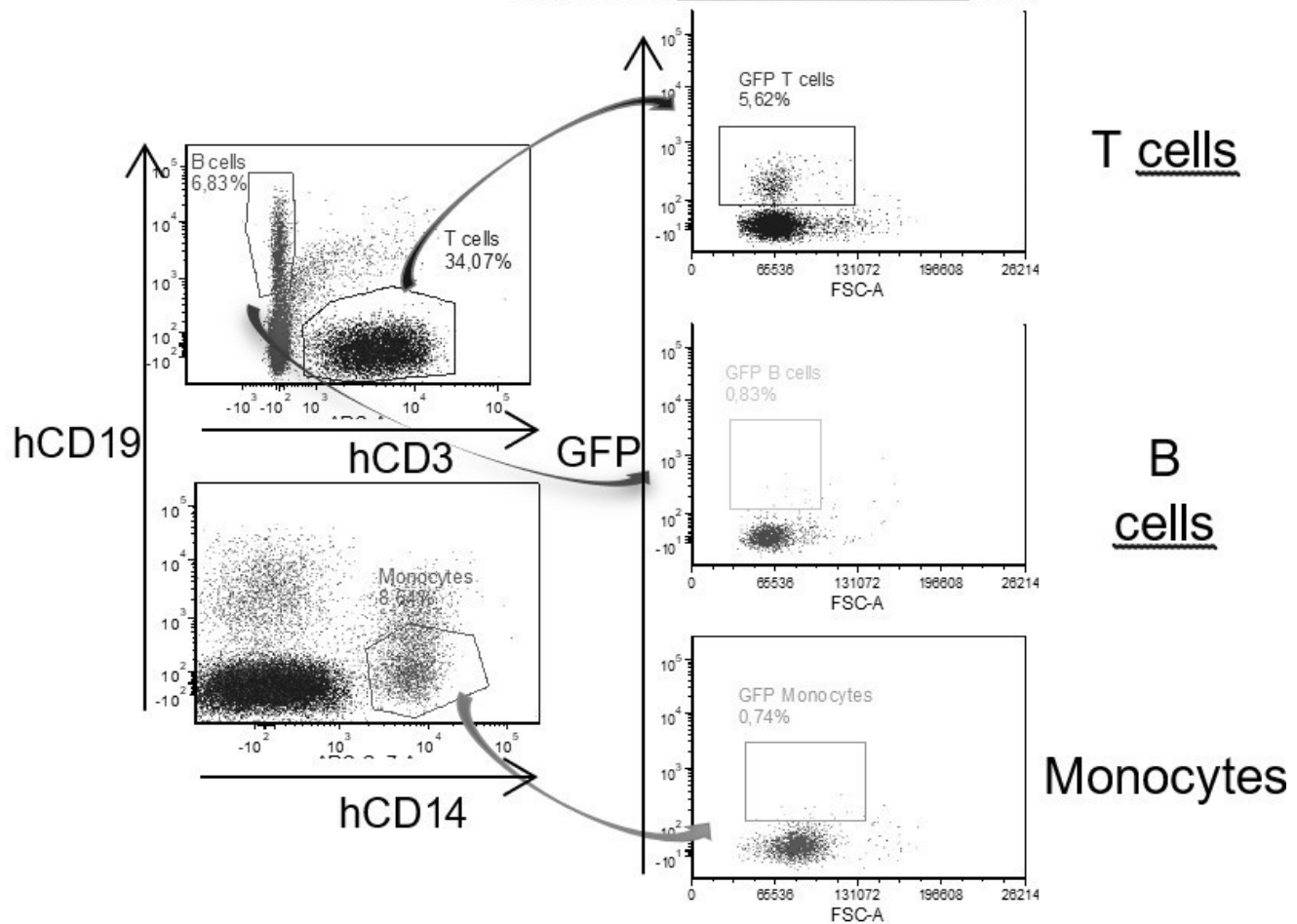


FIG. 7B

BLT mouse – strong promoter

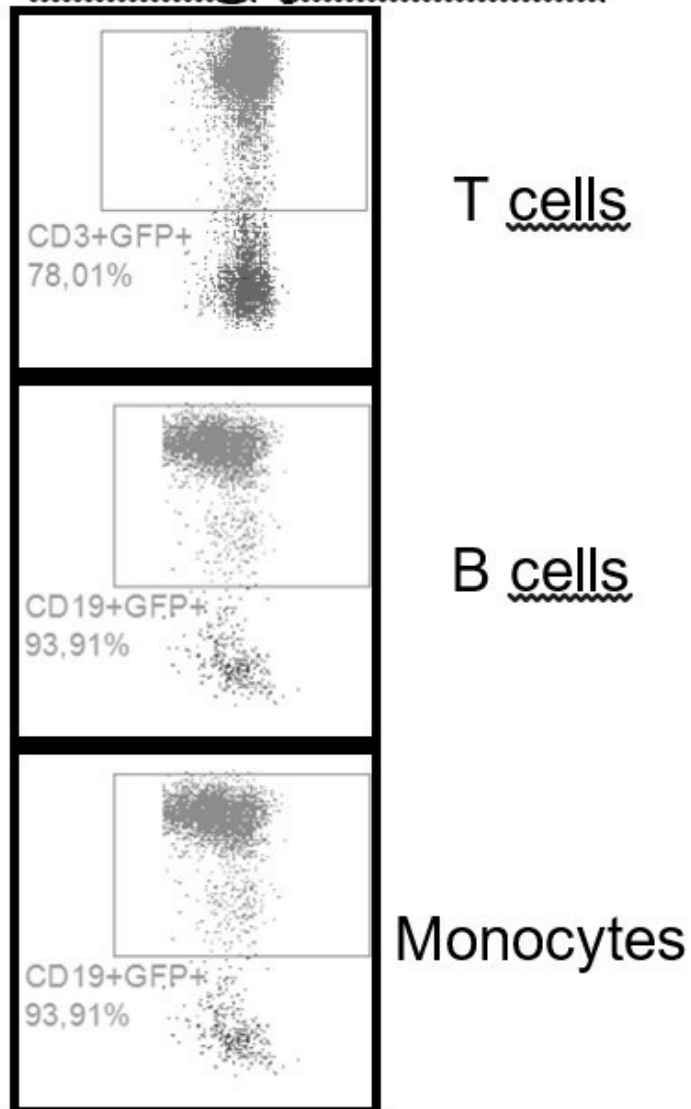


FIG. 7C

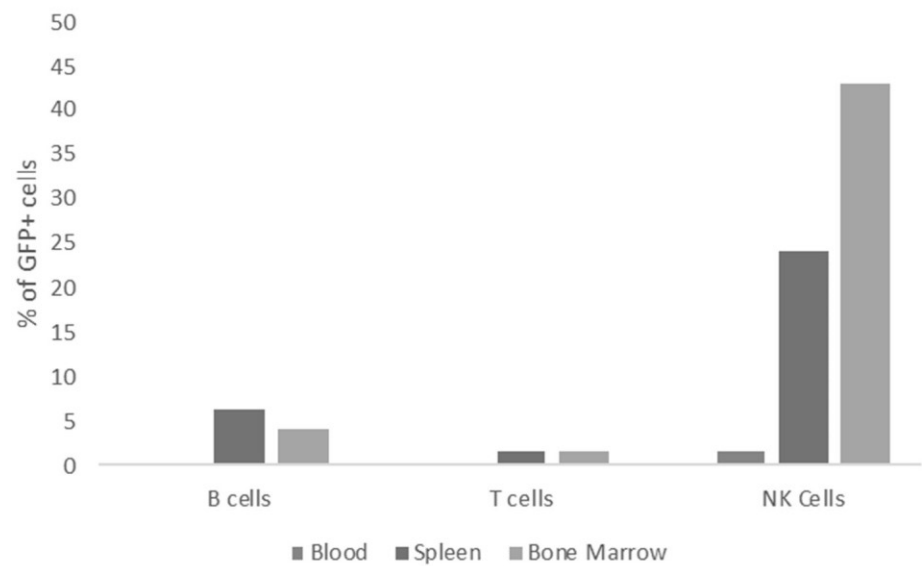


FIG. 8A

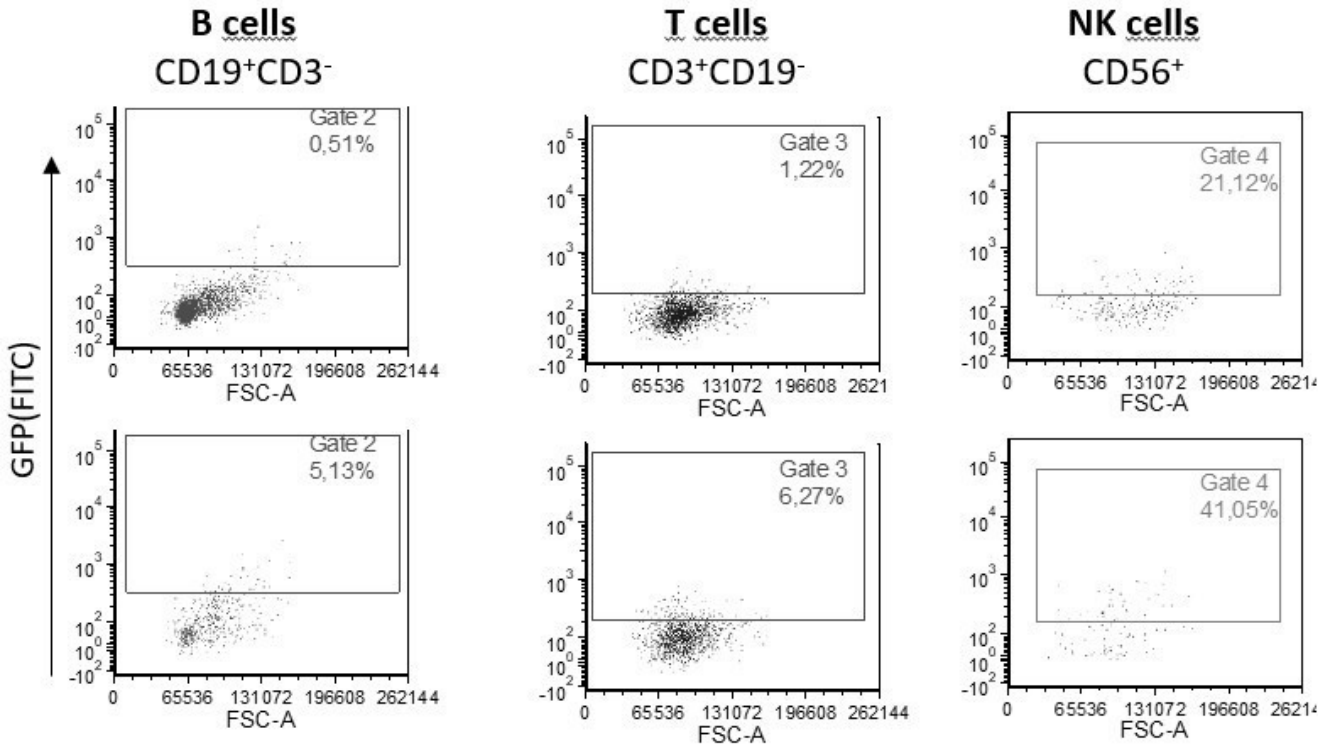


FIG. 8B

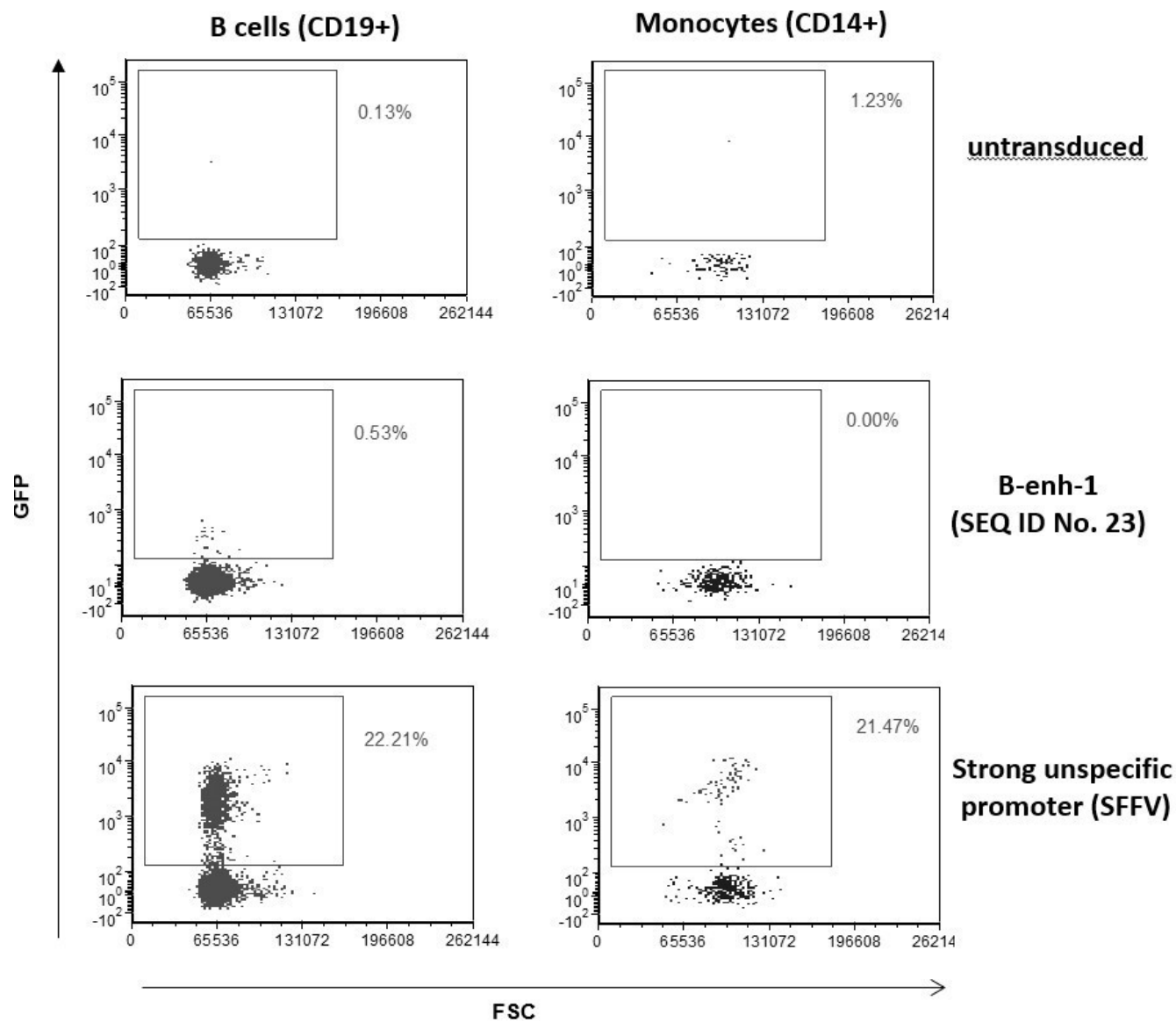


FIG. 9

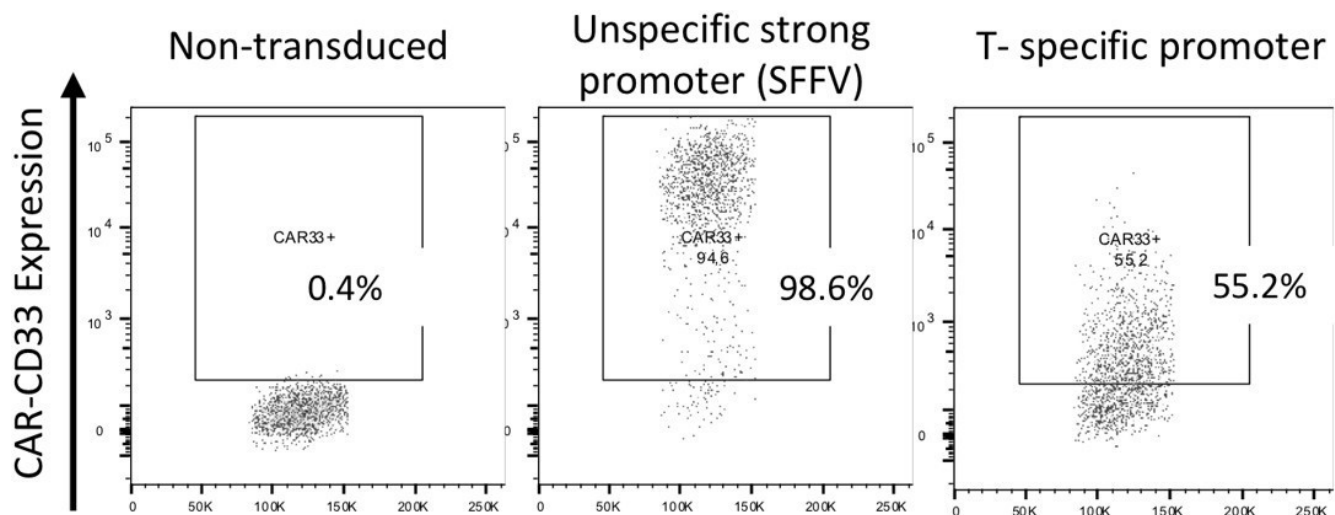


FIG. 10A

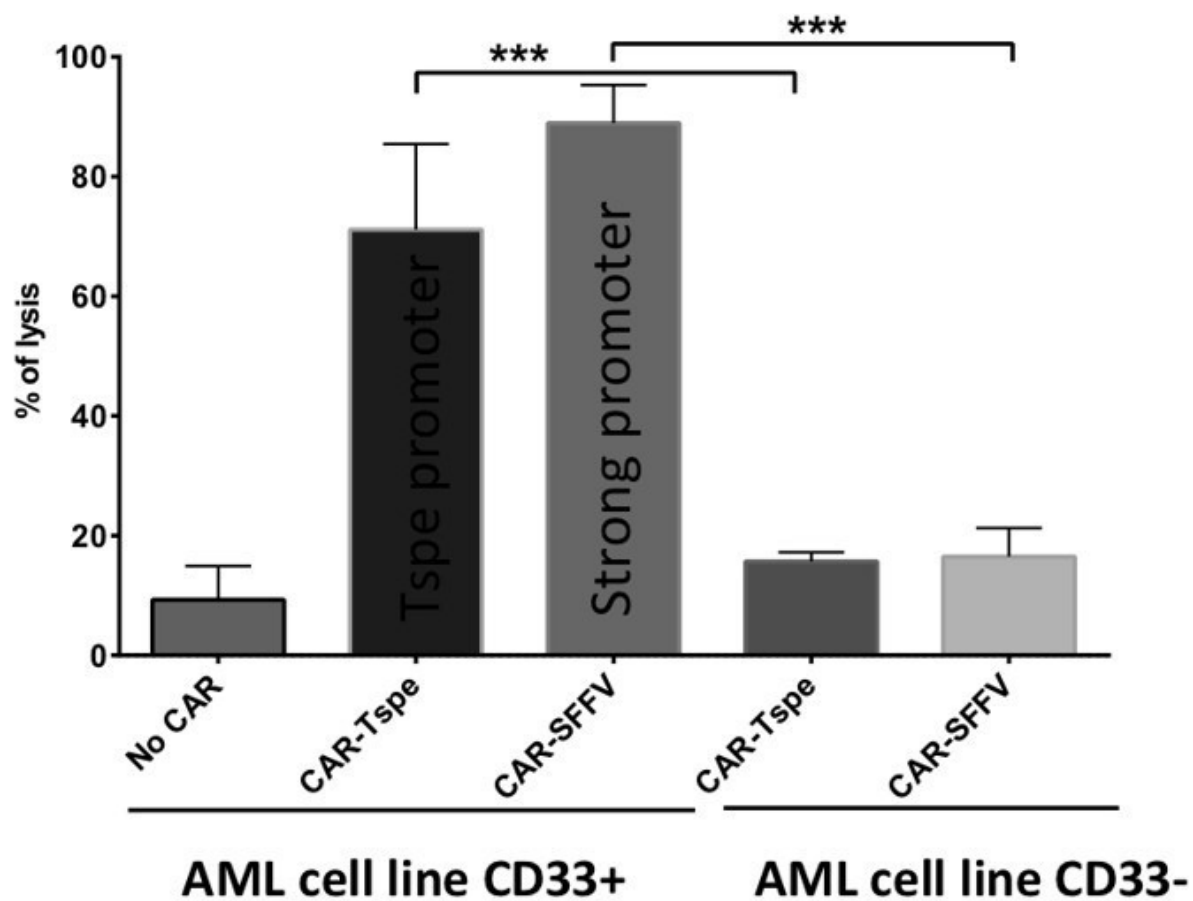


FIG. 10B

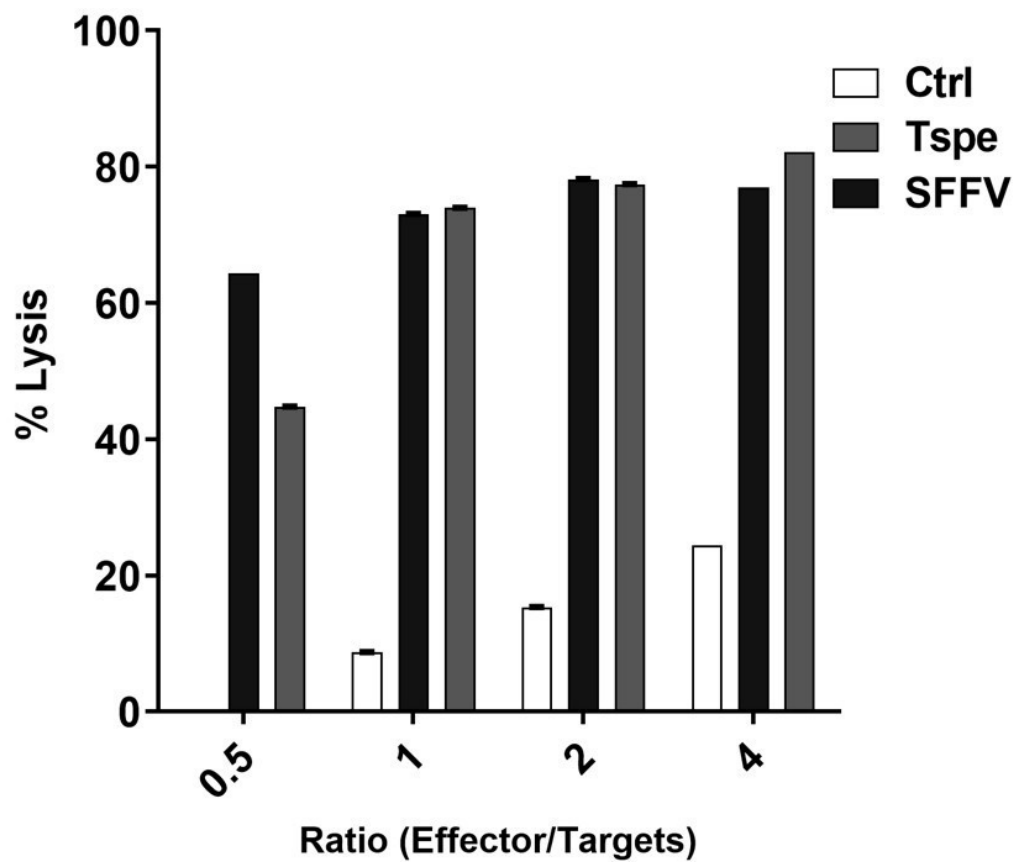


FIG. 10C

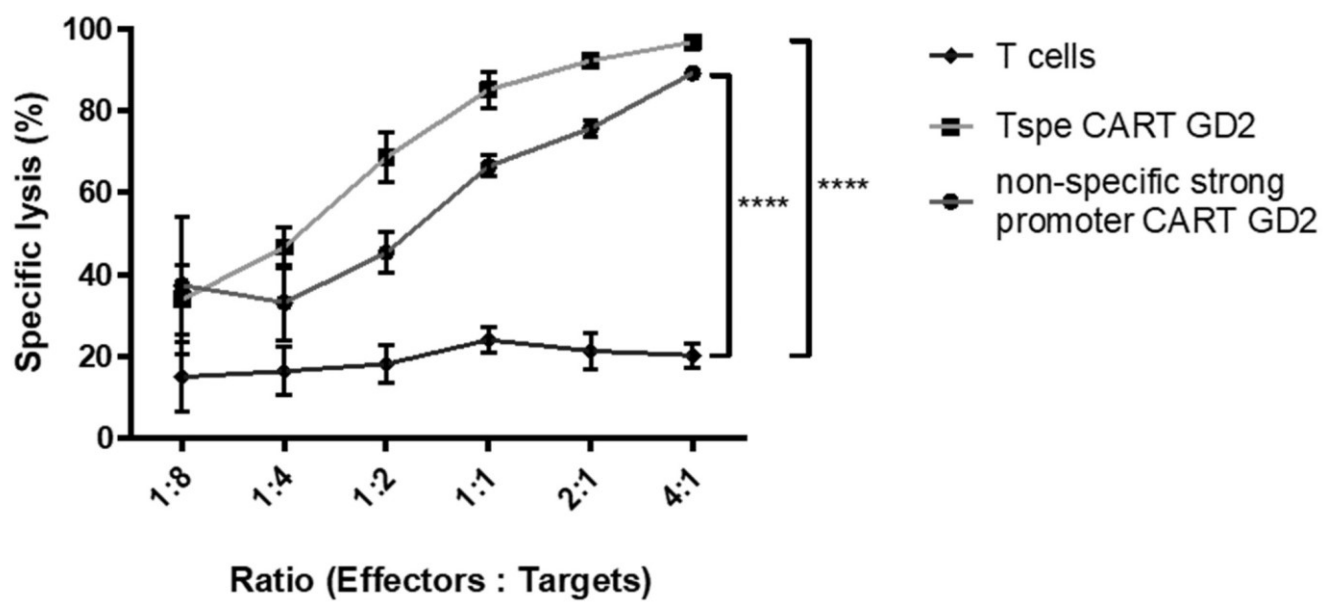


FIG. 10D

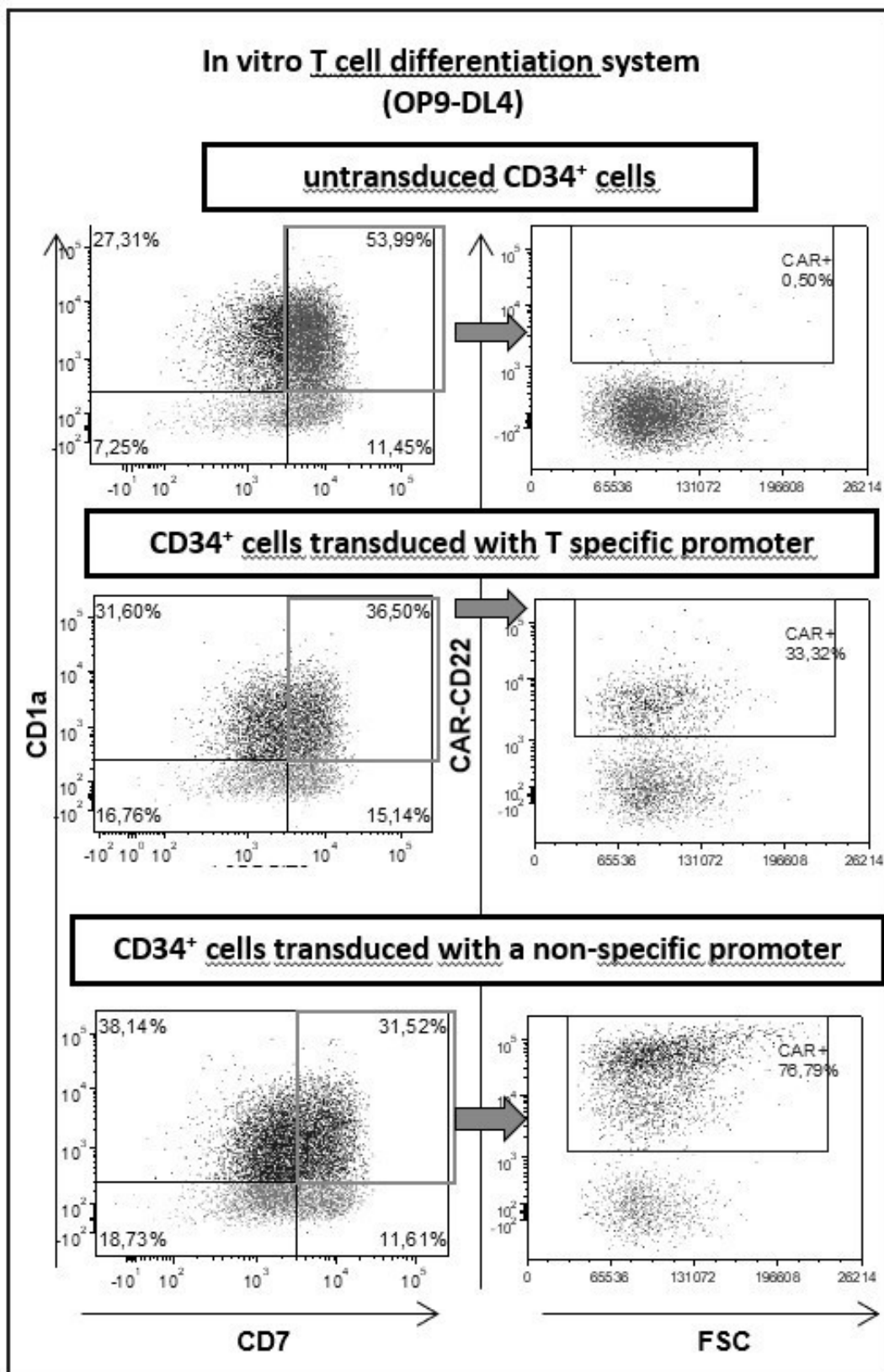


FIG. 11A

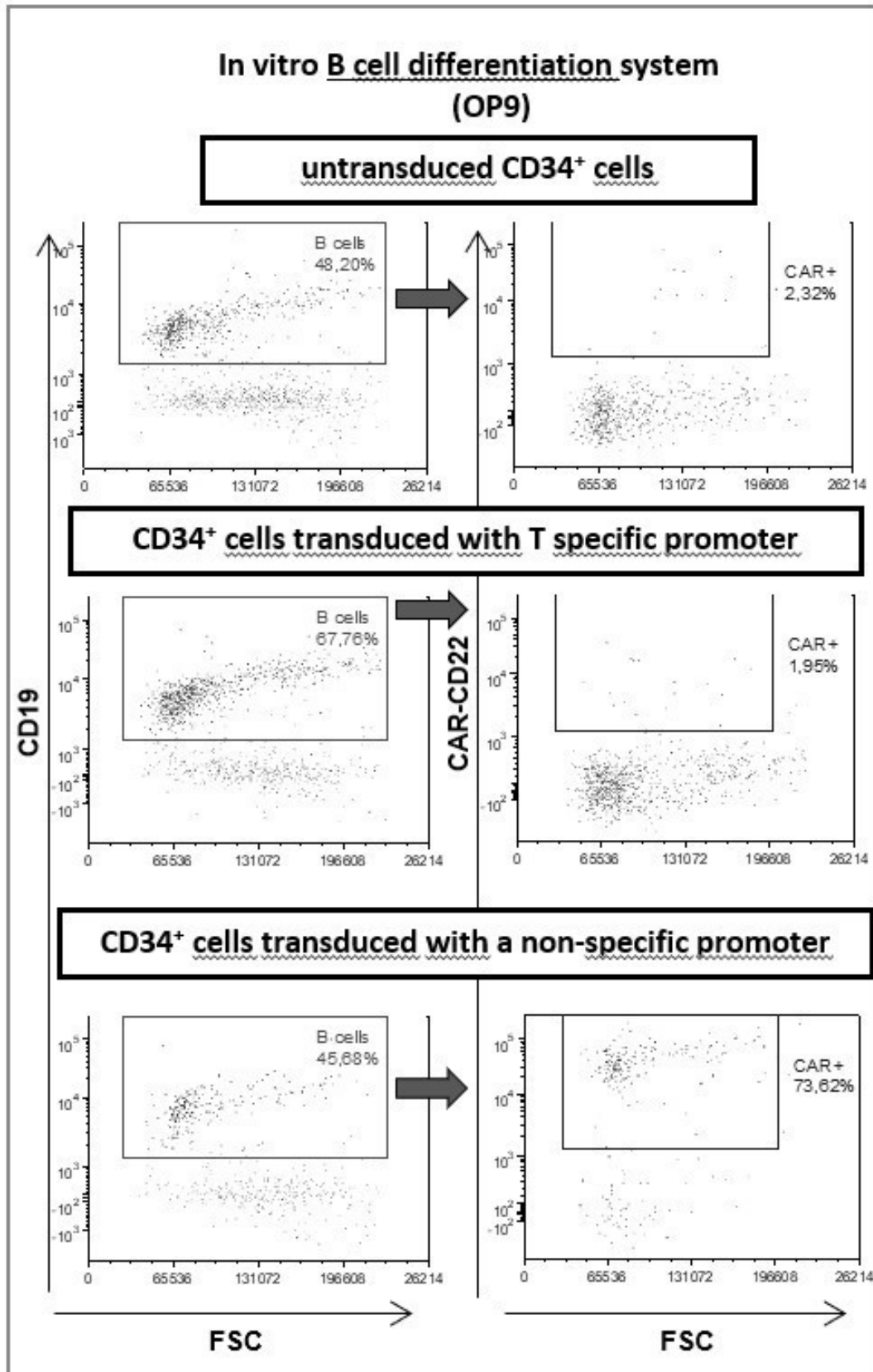


FIG. 11B

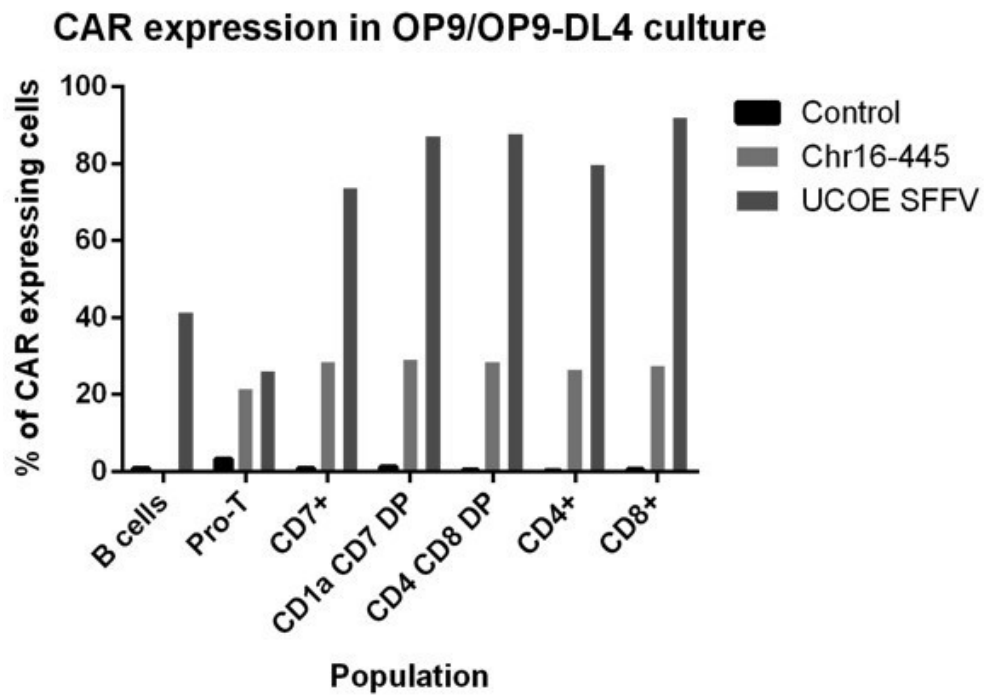


FIG. 11C

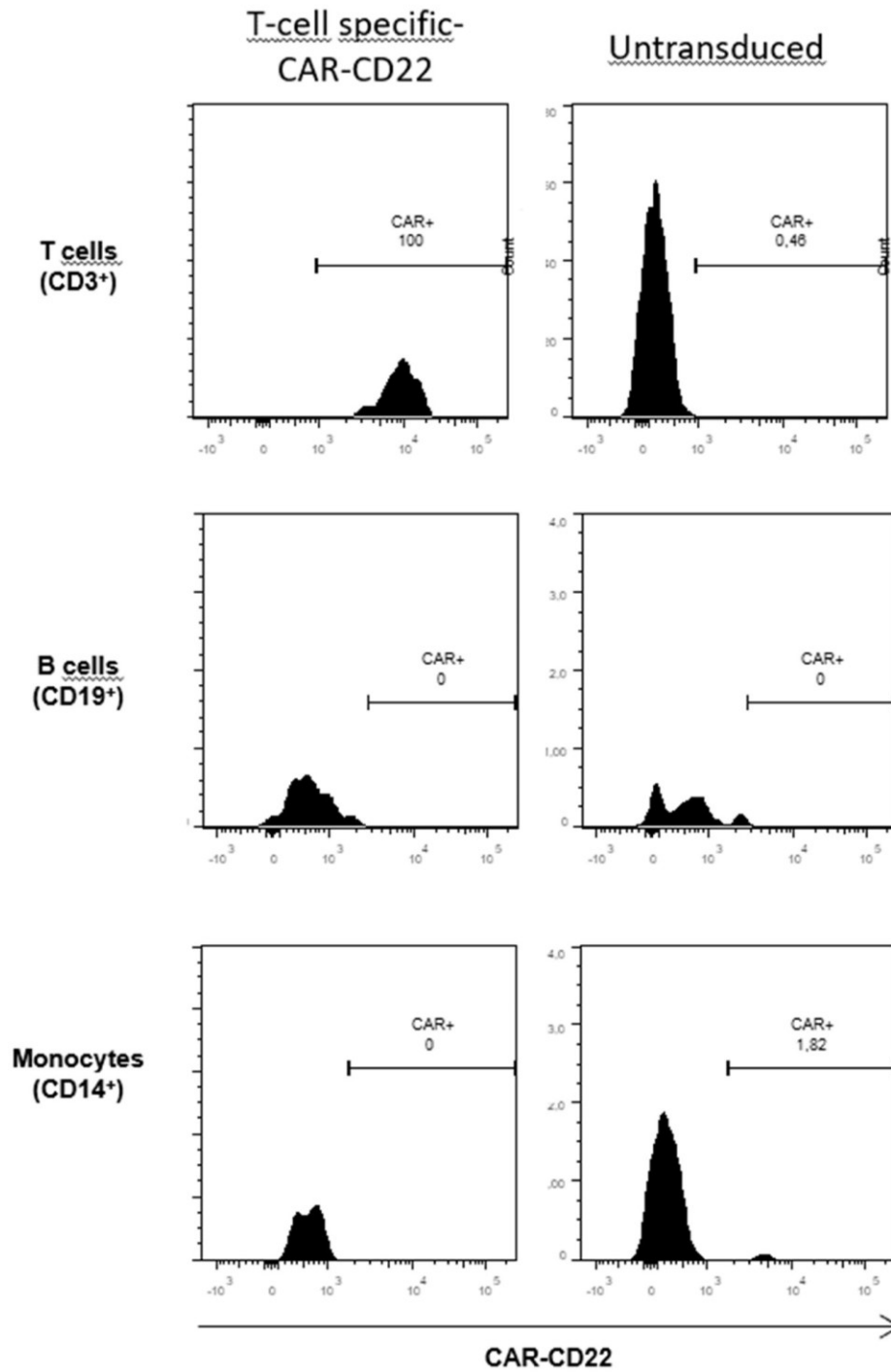


FIG. 12

	C1 bs		C3 bs		C12 bs		C13 bs		C29 bs		C167 bs		C159 bs		C154 bs		C134 bs		C113 bs		C57 bs	
	n	% in pop	n	% in pop	n	% in pop	n	% in pop	n	% in pop	n	% in pop	n	% in pop	n	% in pop	n	% in pop	n	% in pop	n	% in pop
NK	2/11	66,7	2/25	8	3/19	15,8	1/5	20	0	0,00	1/4	33,3	0	0	1/7	33,3	0	0	3/36	100	3/30	100
T	1/11	10	6/25	24	3/19	15,8	0	0	2/11	18,2	0	0	3/8	30	0	0	3/11	30	7/36	70	6/30	60
NKT	7/11	33,3	13/25	52	3/19	52,6	2/5	40	6/11	54,5	2/4	9,5	2/6	9,5	5/7	23,8	6/11	28,6	19/36	90,5	16/30	76,2
B	1/11	16,7	3/25	12	2/19	10,5	5/5	40	3/11	27,3	1/4	16,7	1/6	16,7	1/7	16,7	1/11	16,7	6/36	100	4/30	66,7
B/NK	0/11	0	1/25	4	1/19	5,3		0	0	0,00	0	0	0	0	0	0	1/11	0	1/36	0	1/30	0,00
TOTAL	11		25		19		5		11		4		6		7		11		36		30	

n : column indicates the number of times that this predicted conserved binding site was found within our selected sequences
% in population: indicates the percentage of a cell-population specific enhancer that bears this predicted conserved binding site

FIG. 13

